Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Koransky

MODIFIKATION PENTETRAZOL-INDUZIERTER KRAMPF-ANFÄLLE BEI RATTEN DURCH EINMALIGE AUFNAHME CHLORIERTER KOHLENWASSERSTOFFE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
im Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

KARL-WILHELM T O N N
aus Dortmund

Marburg 1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546006_0068

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Koransky

MODIFIKATION PENTETRAZOL-INDUZIERTER KRAMPF-ANFÄLLE BEI RATTEN DURCH EINMALIGE AUFNAHME CHLORIERTER KOHLENWASSERSTOFFE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
im Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

KARL-WILHELM T O N N
aus Dortmund

Marburg 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1 Einleitung

2 Material und Methoden

2.1 Substanzen

2.2 Versuchstiere

2.3 Applikation der Substanzen

2.4 Erfassung von Pentetrazol und chlorierten Kohlenwasserstoffen in biologischen Proben

2.4.1 Extraktion von Pentetrazol aus Gehirngewebe und Bestimmung der Wiederfindungsrate

2.4.2 Extraktion von chlorierten Kohlenwasserstoffen aus Gehirngewebe und Bestimmung der Wiederfindungsrate

2.4.3 Gaschromatographische Erfassung von Pentetrazol und den verwendeten chlorierten Kohlenwasserstoffen

2.4.4 Auswertung der Gaschromatogramme

2.5 Biotransformation von Pentretrazol in vitro

2.5.1 Präparation der Leberzellfraktionen

2.5.2 Zusammensetzung der Inkubationsansätze

2.5.3 Messung der Radioaktivität im Inkubationsansatz

2.5.4 Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Enzympräparationen

2.5.5 Auswertung der Ergebnisse

2.6 Statistik

3 Ergebnisse

3.1 Verhalten der Versuchstiere nach einmaliger Applikation von Aldrin, Dieldrin, Endrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol

3.2 Empfindlichkeit der Versuchstiere gegenüber Pentetrazol nach einmaliger Gabe von Aldrin, Dieldrin, Endrin, p,p-DDT oder Hexachlorbenzol

- 3.2.1 Wirkung von Aldrin, Endrin und Dieldrin
- 3.2.2 Wirkung einer Einzeldosis von Dieldrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol über die Zeit
- 3.2.3 Wirkung steigender Dosen von Dieldrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol zu einem Zeitpunkt

3.3 Einfluß von Dieldrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol auf die Penetration von Pentetrazol in das Gehirn

- 3.3.1 Wirkung einer einmaligen Gabe von Dieldrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol über die Zeit
- 3.3.2 Wirkung steigender Dosen von Dieldrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol zu einem Zeitpunkt

3.4 Verhalten von Dieldrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol im Zentralnervensystem der Versuchstiere

- 3.4.1 Konzentrationsänderungen nach einmaliger Applikation
- 3.4.2 Konzentrationen nach Applikation steigender Dosen
- 3.4.3 Beziehungen zwischen krampfauslösenden Pentetrazolkonzentrationen im Zentralnervensystem und den Konzentrationen von Dieldrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol

3.5 Biotranformation von Pentetrazol in der Leber unter dem Einfluß von Dieldrin, p,p-DDT, Hexachlorbenzol und Phenobarbital

3.5.1 Umsatzraten in verschiedenen Leberzellfraktionen und nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit p,p-DDT, Dieldrin, Hexachlorbenzol und Phenobarbital

3.6 Elimination von Pentetrazol aus dem Zentralnervensystem nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Dieldrin, p,p-DDTund Hexachlorbenzol

4 Diskussion

5 Zusammenfassung

Einleitung

In der vorgelegten Arbeit werden tierexperimentelle Untersuchungen über Wirkungen von p,p-DDT, Dieldrin, und Hexachlorbenzol dargestellt. Diese drei Substanzen gehören zur Gruppe der chlorierten Kohlenwasserstoffe, welche seit etwa 35 Jahren in großem Umfang zur Bekämpfung der Überträger zahlreicher Seuchen, zur Vernichtung von Schädlingen auf Feldfrüchten, zum Schutz von Ernteerträgen, vor Insektenfraß oder Befall mit Pilzen sowie als Zusatz mancher chemischer Produkte verwendet werden.

Von ihnen ist DDT wohl die bekannteste und am besten untersuchte Substanz. Es wurde erstmals 1874 durch O. Zeidler in Straßburg synthetisiert, seine insektizide Wirksamkeit jedoch erst 1939 durch die Arbeiten von P. Müller in Basel bekannt. Seit 1942 wird DDT weltweit mit großem Erfolg zur Vernichtung der Überträger , z.B. der Malaria, der Pest, des Gelbfiebers oder des Fleckfiebers eingesetzt. Bei Zufuhr einer ausreichenden Dosis kann DDTnicht nur bei Insekten, sondern auch bei Warmblütern Vergiftungen auslösen, bei denen Funktionsstörungen des Nervensystems besonders hervortreten. Diese äußern sich in erhöhter Erregsamkeit, Tremor, Ataxien, Konvulsionen und Lähmungen, die dann zum Tode führen können (s. Übersicht Hrdina et al. 1975). Nach oraler Zufuhr wird die akute LD50 bei der Ratte mit 200 - 400 mg DDT/kg Körpergewicht angegeben (KLIMMER 1955, GAINES 1960) .

Neben dem DDT fand weltweit auch Dieldrin Verwendung. Es gehört zusammen mit Aldrin, Endrin und Heptachlor zur Gruppe der Cyclodien-Chlorkohlenwasserstoffe, welche hauptsächlich zum Schutz landwirtschaftlicher Nutzflächen vor Schädlingen dienen. Substanzen dieser Gruppe können auch beim Warmblüter Vergiftungen auslösen, zu deren Bild ebenfalls eine gesteigerte Erregbarkeit, Tremor, Koordinationsstörungen, Konvulsionen, Apathie und Lähmungen gehören (KLIMMER 1955, HODGE ET AL. 1967, s. Übers. JAGER 1970). Auch beim Menschen wurden gleichartige Vergiftungserscheinungen beobachtet (GARETTSON ET AL. 1969, GLASS 1975).

Cychlodien-Chlorkohlenwasserstoffe weisen im allgemeinen eine höhere akute Toxizität für den Warmblüter auf als DDT. So liegt die LD50 nach oraler Zufuhr an Ratten bei 45 - 65 mg Dieldrin/kg Tier und bei dem Isomeren des Dieldrin, dem Endrin, sogar bei nur 15 - 21 mg/kg (KLIMMER 1955), (GAINES 1960).

Hexachlorbenzol, das seit etwa 20 Jahren vor allem zum Beizen von Saatgut gegen Pilzbefall verwendet wird und in manchen chemischen Produkten als Verunreinigung enthalten ist, weist eine deutlich geringere akute Toxizität auf als Dieldrin und DDT. Nach oraler Zufuhr einer Suspension wird die LD50 bei Ratten mit mehr als 9,8 g Hexachlorbenzol/kg Tier (!) angegeben (KLIMMER 1971). Auch bei dieser Substanz wurden Störungen des Nervensystems in Form von Tremor, gesteigerter Erregbarkeit und Konvulsionen beobachtet, jedoch erst nach mehrtägiger Zufuhr (DE MATTEIS ET AL. 1961, KHERA 1974). Von größerer

Bedeutung waren dagegen schwere Störungen der Hämsynthese, welche nach längerer Zufuhr von Hexachlorbenzol auftreten können und sich beim Menschen als ein Krankheitsbild äußern, das der Porphyria cutanae tarda sehr ähnlich ist. Derartige Porphyrien wurden erstmals in großem Umfang 1957/58 in der Türkei beobachtet, als mehrere tausend Personen, welche mit Hexachlorbenzol gebeiztes Saatgetreide verzehrt hatten, schwer erkrankten (CAM 1960). Viele dieser Patienten, insbesondere die Kinder, die Hexachlorbenzol aufgenommen hatten, waren besonders empfindlich gegenüber lebensbedrohenden Störungen des Porphyrinstoffwechsels (PETERS 1976).

Über die eben beschriebenen Effekte hinaus haben DDT, Dieldrin und Hexachlorbenzol dadurch Bedeutung erlangt, daß sie sehr stabil sind gegenüber chemischen und biochemischen Reaktionen, die zu ihrem Abbau führen. Sie halten sich daher sehr lange in wirksamer Form in der Umwelt. Zu dieser langen Persistenz chlorierter Kohlenwasserstoffe im Boden und in Gewässern kommt hinzu, daß diese Substanzen eine große Lipophilie besitzen. Durch diese physikalisch-chemische Eigenschaft reichern sie sich in lipoidhaltigen Anteilen von pflanzlichen und tierischen Organismen an und gelangen über die Nahrung zum Menschen (s. Übers. FISHBEIN 1974). In dessen Geweben, insbesondere dem Fettgewebe, der Leber und dem Gehirn finden sich schon seit Jahren erhebliche Mengen von DDT, Dieldrin und Hexachlorbenzol (RADOMSKI ET AL. 1968, ACKER und

SCHULTE 1971, 1974, ABBOT 1972, ORLOFFS 1974, KRAUL u. KARLOG 1976 u.a.), welche dann auch in der lipoidhaltigen Muttermilch auftreten und in erheblichen Mengen an Neugeborene weitergegeben werden können (DYMANT ET AL. 1971, SIYALI 1973, TOLLE ET AL. 1974, BACHEN u. SLIP 1976). Welche Folgen die Speicherung chlorierter Kohlenwasserstoffe in den Geweben hat, ist für den Menschen noch nicht abzuschätzen. Bei verschiedenen Warmblütern bewirkt die langfristige Verabreichung von kleinen Dosen an DDT und Dieldrin unter anderem Veränderungen im Stoffwechsel zahlreicher körpereigener wie körperfremder Stoffe (HART u. FOUTS 1963, CONNEY 1967 u.a.), Induktion von Leberwachstum (s. Übers. SCHULTE HERMANN 1974), Störungen der Reproduktion und ein möglicherweise vermehrtes Auftreten von Tumoren an blutbildenden Organen und der Leber (s. Übers. DEICHMANN 1972, FISHBEIN 1974). Angesichts der Tatsache, daß sich im Organismus von Mensch und Tier Fremdstoffe aufhalten, die langfristig in ihren möglichen Wirkungen nicht voll zu übersehen sind, erscheint es wünschenswert, weitere Informationen über Effekte von DDT, Dieldrin und Hexachlorbenzol beim Warmblüter zu erhalten.

So wurden in eigenen Experimenten Versuche von HERKEN und Mitarbeitern fortgeführt, in denen sich gezeigt hatte, daß polychlorierte Kohlenwasserstoffe , wie

vier Isomere des Hexachlorcyclohexans, DDT und Dieldrin, die krampfauslösende Wirkung von Pentetrazol, Scillirosid, Paraoxon und Nikethamid vermindern können (HERKEN 1950, 1951; NEUBERT und SCHÄFER 1958, GHAZAL ET AL. 1964). Als Ursache des Wirkungsverlustes von Scillirosid, Paraoxon und Nikethamid könnte eine beschleunigte Biotransformation dieser Krampfgifte im Organismus Hexachlorcyclohexan-DDT- oder Dieldrinvergifter Versuchstiere gefunden werden (KORANSKY ET AL. 1964; GHAZAL ET AL. 1964, PORTIG ET AL. 1972). Der Wirkungsverlust von Pentetrazol jedoch, der auch dann eintritt, wenn dieses Krampfgift intravenös injiziert wird (HERKEN ET AL. 1952), ist nicht auf eine beschleunigte Biotransformation von Pentetrazol zurückzuführen, sondern auf eine Wechselwirkung zwischen Alpha-Hexachlorcyclohexan und Pentetrazol im Zentralnervensystem, wobei mit zunehmenden Konzentrationen von Alpha-Hexachlorcyclohexan im Gehirn auch die Konzentrationen von Pentetrazol im Gehirn, bei denen ein Krampfanfall auftritt, steigen muß (VOHLAND ET AL. 1972). Ähnlich wie das Alpha-Hexachlorcyclohexan sind auch das Beta-, Gamma- und Delta-Isomer des Hexachlorcyclohexans in der Lage, die Empfindlichkeit des Zentralnervensystems für Pentetrazol zu reduzieren (VOHLAND, unveröffentlichte Befunde). Die geschilderten Daten ergaben noch keinen Einblick in den Mechanismus

der antikonvulsiven Wirkung der Hexachlorcyclohexane gegenüber Pentetrazol.

Um weiteren Einblick in die Art der Wechselwirkung zwischen chlorierten Kohlenwasserstoffen und Pentetrazol im Nervensystem zu bekommen, wurden die Experimente von GHAZAL ET AL. 1964 und GHAZAL 1964 mit dem Ziel fortgeführt, zu differenzieren, ob der beschriebene Wirkungsverlust von Pentetrazol bei DDT- und Dieldrin-vergifteten Tieren auf eine beschleunigte Entgiftung von Pentetrazol zurückzuführen ist oder auch auf eine direkte Wechselwirkung von DDT und Dieldrin mit Pentetrazol im Bereich des Nervensystems. Sollte letzteres sich nachweisen lassen, so könnten die umfangreichen Daten über Wirkungen von DDT und Dieldrin am Nervensystem (s. Übers. von HRIDINA NAHARASHI) auch zu einem besseren Verständnis der Wirkung von Hexachlorcyclohexan beitragen. Zu diesem Zweck wurde nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit DDT und Dieldrin geprüft, welche Konzentrationen der Chlorkohlenwasserstoffe und von Pentetrazol sich während des Krampfanfalls im Gehirn finden lassen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob DDT und Dieldrin die Biotransformation von Pentetrazol beeinflussen können und ob eine in vitro nachgewiesene Beschleunigung der Biotransformation von Pentetrazol auch in vivo zu einer Verminderung der Wirkung von Pentetrazol bei DDT- und Dieldrin-vergifteten Tieren führen kann.

In Anbetracht der toxikologischen Bedeutung des weit verbreiteten und auch in den Geweben des Menschen vorkommenden Hexachlorbenzols, wurde auch diese Substanz in die Untersuchungen miteinbezogen.

2.1 Herkunft und Reinheit der Substanzen

Herkunft, chemische Zusammensetzung, Schmelzpunkte und Molekulargewichte der eingesetzten Substanzen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Bei den chlorierten Kohlenwasserstoffen der Cyclodiengruppe, Aldrin, Dieldrin und Endrin sowie bei den stereoisomeren Verbindungen i-p-DDT und p-p-DDT, handelt es sich um Eichsubstanzen zur Pestizid-Analytik mit einer angegebenen Reinheit von mehr als 99 % . Das von der Firma Fluka bezogene Hexachlorbenzol wurde vor seinem Gebrauch viermal aus heißem Benzol umkristallisiert.

Die eingesetzten chlorierten Kohlenwasserstoffe wurden gaschromatographisch mit Hilfe des Flammenionisationsdetektors und des Elektroneneinfangdetektors auf verschiedenen stationären Phasen auf ihre Reinheit überprüft (Geräteeinstellung siehe 2.4.4). Dabei zeigten alle eingesetzten Substanzen einheitliche Hauptsignale. Bei p,p-DDT und Dieldrin traten zusätzlich noch jeweils ein kleines Nebensignal auf (siehe ABB. 1, ABB. 2).

^{14}C markiertes Pentetrazol wurde von Herrn Dr. P.E. SCHULZE , Isotopenlabor der SCHERING AG, Berlin, hergestellt. Die Synthese ging vom uniform markierten ^{14}C - Benzol aus, das über Cyclohexanol zum Cyclohexanon oxidiert wurde.

Letzteres wurde dann mit Stickstoffwasserstoffsäure zu Pentetrazol umgesetzt. In dem so entstandenen Pentetrazol sind damit alle Kohlenstoffatome des Pentamethylenringes radioaktiv markiert. Bei dünnschichtchromatographischer Kontrolle betrugen die radioaktiven Verunreinigungen weniger als 1 % .

Das entstandene Pentetrazol hatte einen Schmelzpunkt von 58° - 59° C. (Literatur 57° - 60° C, D'ANS-IAX 1964). Seine spezifische Radioaktivität betrug 11mCi/mMol = 79,6 µCi/mg.

Nikotinadenindinucleotidphosphat und Isocitratdehydrogenase wurden von der Firma BOEHRINGER, Mannheim, Isocitronensäure von der SIGMA COMP. (USA) und $MgCl_2$ p.a. von der Firma MERCK, Darmstadt, bezogen.

WHO-Name	chem. Benennung	Molekulargewicht	Schmp. °C	Herkunft d.Substanz
Pentetrazol	Pentamethylentetrazol	138,17	56 - 57 (Lit* 57-58-60)	KNOLL AG Ludwigshafen
Phenobarbital	5 Äthyl-5phenylbarbitursäure Natriumsalz	254,22	177 (Lit* 174-178)	MERCK AG Darmstadt
Aldrin	Hexachlor-hexa-hydro-endoexo-obimethyl-naphthalin	364,92	104,5 (Lit* 104-104,5)	EHRENSTORFER Augsburg
Dieldrin	Hexachlor-epoxa-oktahydro-endo-exo-dimethylen-naphthalin	380,91	171 (Lit* 175-176)	EHRENSTORFER Augsburg
Endrin	Hexachlor-epoxy-okta hydro-endo-endodimethylnaphthalin	380,91	231 - 238 (Lit. 226 - 228 WILD 1946)	EHRENSTORFER Augsburg
Hexachlorbenzol	Hexachlorbenzol	284,78	226 (Lit* 229,5)	FLUKA AG Bucks, Schweiz
p,p-DDT puriss.	p,p Dichlordiphenyltrichloräthan	321,58	107 (Lit* 105-109)	FLUKA AG Bucks, Schweiz
o,p-DDT	o-p-Dichlordiphenyltrichloräthan	321,58	75 - 78 (Lit* 75)	EHRENSTORFER Augsburg

Tab. 1

*D'ANS LAX Taschenbuch für Chemiker und Physiker, II. Band, Auflage 1964, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg

*Chemie des Pflanzenschutzes und Bekämpfungsmittel Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg

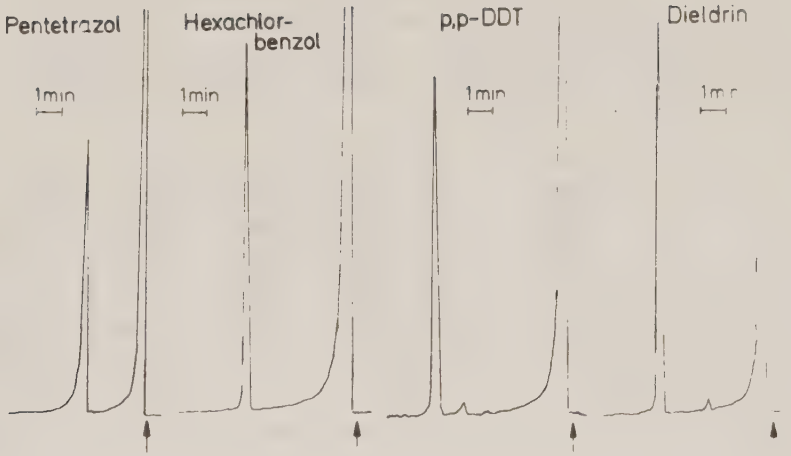


Abb. 1 Gaschromatogramme der untersuchten Substanzen analysiert mit Hilfe des Flammenionisationsdetektors

Säulenbedingungen: Glassäule 2,04 m lang, 2,8 mm innerer Durchmesser; 3% OV-1 auf Gaschrom Q, 100-120 mesh; Säulentemperatur bei der Analyse von Hexachlorbenzol und Pentetrazol 150°C, von Dieldrin 180°C und von DDT 210°C. Temperatur des Einspritzblocks 220°C, des Detektors 260°C, Detektorempfindlichkeit 10 x 8. Von den geprüften Substanzen wurde jeweils 1 µg analysiert. Der Zeitpunkt der Applikation wird durch Pfeile markiert. Die Chromatogramme werden von links nach rechts aufgezeichnet.

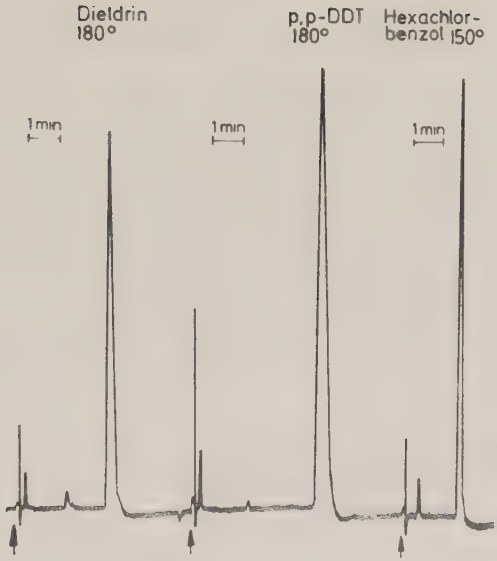


Abb. 2 Gaschromatogramme der untersuchten Chlorkohlenwasserstoffe analysiert mit Hilfe des halogensensiblen Elektroneneinfangdetektors

Allgemeine Bedingungen vgl. Abb. 1 ; die Säulentemperaturen betrugen bei der Analyse von Hexachlorbenzol 150°C, bei derjenigen von Dieldrin und DDT je 180°C. Detektortemperatur 300°C; Detektorempfindlichkeit 50 µsec; Pulsintervall 10 x 16. Analysiert wurden Substanzmengen von 1ng. Die Chromatogramme wurden von rechts nach links aufgezeichnet.

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 7 - 12 Wochen alte, weibliche Wistar-Ratten (SPF-Tiere des Zentralinstituts für Versuchstierzucht, Hannover) mit einem Körpergewicht zwischen 90 und 150 gr. Sie wurden in einem ruhigen, klimatisierten Stall bei etwa 22° C Raumtemperatur in Gruppen von je fünf Tieren gehalten und mit Standard Pressfutter (R-1320 der Firma ALTROMIN, Lage) sowie mit Leitungswasser ad libitum ernährt.

Die Versuche, in denen die Reaktion der Versuchstiere auf Pentetrazol getestet wurde, fanden sämtlich in der Zeit von 08.00 - 12.00 Uhr vormittags statt.

2.3 Applikation der Substanzen

Die untersuchten Chlorkohlenwasserstoffe wurden in Rapsöl (DAB - 7) gelöst, die Cyclodien-Insektizide und die DDT-Isomere bei Zimmertemperatur in folgenden Konzentrationen: Aldrin 0,6%ig, Dieldrin 0,6%ig, Endrin 0,1%ig und o,p-DDT und p,p-DDT 2%ig. Diese öligen Lösungen wurden den Versuchstieren intraperitoneal injiziert. Die Dosierung betrug bei Aldrin: 30 mg/kg, Endrin: 5 mg/kg, Dieldrin: 1,0 - 30 mg/kg und DDT 50 mg/kg - 200 mg/kg.

Hexachlorbenzol ließ sich in leicht erwärmtem Rapsöl (37°- 40° C) in einer Konzentration von 1,2 % lösen. Diese Lösung wurde den Tieren in einer Dosis von 45 - 360 mg/kg verabreicht. 45 - 180 mg/kg wurden einmalig intraperitoneal injiziert. Höhere Dosen wurden jeweils zur einen Hälfte intraperitoneal und zur anderen Hälfte durch die Schlundsonde gegeben.

Zur Stimulierung der in den Lebermikrosomen lokalisierten, arzneimittelabbauenden Enzyme wurden an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils 100 mg/kg Phenobarbiral-Natrium (1 %ig in physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal gegeben, und am Tage nach der letzten Phenobarbitalgabe die Lebern zur Präparation der einzelnen Zellfraktionen entnommen.

Pentetrazol wurde 0,8 %ig in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Es wurde entweder in einer Dosis von 40 mg/kg subcutan injiziert, oder aber intravenös über die Schwanzvene mit Hilfe einer Infusionsmaschine (Firma BRAUN/Melsungen) den frei beweglichen Versuchstieren zugeführt. Dabei wurden die Empfehlungen von HINT und RICHTER (1958) eingehalten. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 0,53 ml/min, so daß den Versuchstieren 4,24 mg Pentetrazol/min infundiert wurden.

Die Infusion der Pentetrazollösung löste bei den Versuchstieren nacheinander folgende Reaktionen aus: Unmittelbar nach Infusionsbeginn verhielten sich die Tiere ruhig. Nach etwa 10 - 15 sec Infusionsdauer nahm die motorische Aktivität zu. Die Tiere liefen im Käfig herum und setzten vermehrt Kotballen ab. Wenig später zeigte sich eine stetig zunehmende Ataxie. Nach etwa 40 - 50 Sekunden Infusionsdauer traten einzelne ruchartige Zuckungen der Rückenmuskulatur und der vorderen Extremitäten auf (sog. Kloni). Die Tiere verhielten sich zwischen den einzelnen Zuckungen ruhig. Nach etwa 50 - 60 Sekunden Infusionsdauer häuften sich die Kloni. Die Tiere richteten sich innerhalb weniger Sekunden unter fortlaufenden Zuckungen der Rückenmuskulatur und der vorderen Extremitäten in "Känguruh-Stellung" auf und fielen nach rückwärts um (klonischer Krampf-

anfall). Bei einigen Tieren gingen die einzelnen Zuckungen nicht in einen klonischen Krampf über. Es setzte vielmehr unvermittelt ein Krampfanfall ein mit starrer Anwinklung der vorderen und starrer Streckung der hinteren Extremitäten bei gleichzeitiger Überstreckung der Rückenmuskulatur. (tonischer Streckkrampf)

Beim Auftreten eines klonischen Krampfanfalls (Serie von Einzelzuckungen in "Känguruhstellung") oder tonischen Streckkrampfes, wurde die Infusion sofort beendet, die Tiere dekapitiert und die Gehirne für die Bestimmung ihres Gehaltes an Pentetrazol und an chlorierten Kohlenwasserstoffen entnommen. Aus der Infusionszeit und dem Tiergewicht wurde anschließend die krampfauslösende Pentetrazoldosis für jedes einzelne Tier errechnet.

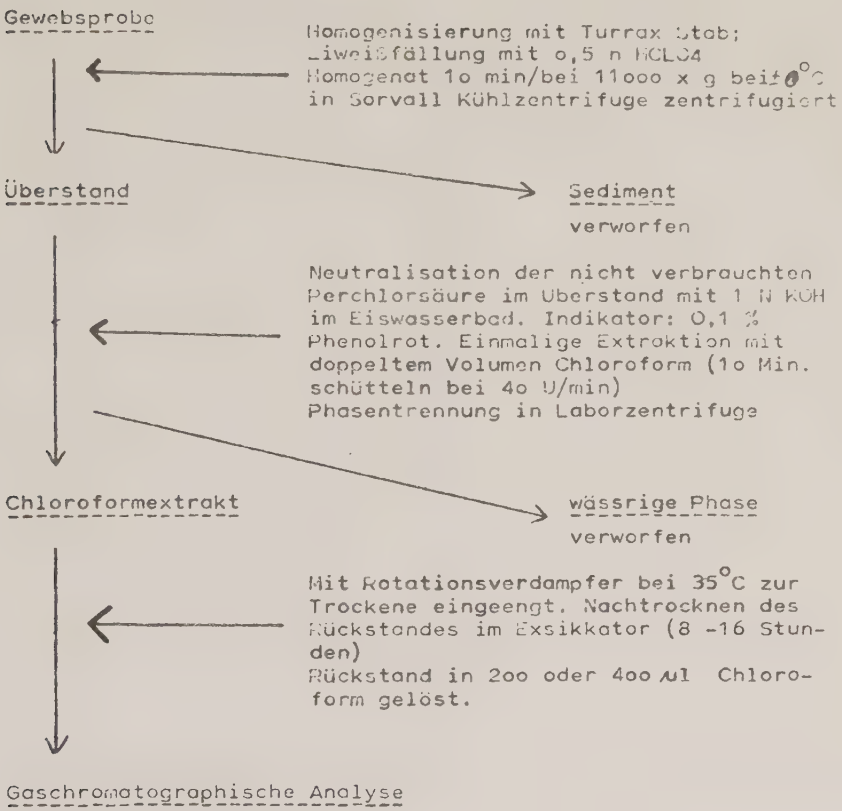
2.4 Extraktion und quantitative Bestimmung von Pentetrazol und chlorierten Kohlenwasserstoffen im Gehirn

2.4.1 Extraktion von Pentetrazol aus Gehirngewebe

Die Aufbereitung des Gehirns für die Gehaltsbestimmung an Pentetrazol erfolgte nach den Angaben von VOHLAND und KORANSKY 1972 und ist schematisch in Abb. 3 wiedergegeben. Unmittelbar nach Dekapitation des Tieres wurde das gesamte Gehirn entnommen, in eisgekühlte Perchlorsäure (1 ml 0,5n Perchlorsäure/g Gewebe) gebracht und mit einem Ultraturrax (Firma JANKE und KUNKEL) homogenisiert. Das ausgefällte Protein wurde anschließend in der Ultrazentrifuge bei 11 000 x g abgetrennt. Der Überstand wurde abgegossen und die überschüssige Perchlorsäure mit Kalilauge unter Verwendung von Phenolrot als Indikator neutralisiert. Anschließend wurde einmal mit dem doppelten Volumen Chloroform extrahiert. Der Chloroformextrakt wurde am Rotationsverdampfer mit Wasserbad bei 35° C zur Trockene eingeengt, der Rückstand im Exsikkator getrocknet und erst unmittelbar vor der gaschromatographischen Analyse in 200 oder 400 µl Chloroform wieder gelöst. Diese Lösung wurde gaschromatographisch analysiert.

Abb. 3

Schematische Darstellung der Isolierung von Pentetrazol aus Geweben



In Vorversuchen wurde die Extraktionsausbeute ermittelt. Dazu wurde zu Homogenat aus 0,5 g Gehirngewebe steigende Pentetrazolmengen gegeben und der Ansatz nach dem in Abbildung 3 dargestellten Verfahren aufgearbeitet. Hierbei zeigte sich, daß im Konzentrationsbereich von 4 - 32 µg Pentetrazol/g Gehirn-Frischgewebe die Extraktionsausbeute konstant blieb und im Mittel 83,85 +- 2,57 % betrug.
(vgl. Tabelle 2)

Pentotrazol zugegeben - µg -	Pentetrazol wiedergefunden		n
	- µg -	%	
4	3,3o ± o,4o	82,5o ± 1o	4
8	6,53 ± o,69	81,66 ± 8,62	3
16	13,4o ± 2,o7	83,77 ± 12,93	3
32	28,64 ± 2,54	87,5o ± 7,93	4

Tab. 2 Wiederfindung von Pentetrazol aus Gehirngewebe

2.4.2 Extraktion der chlorierten Kohlenwasserstoffe aus Gehirngewebe

Unmittelbar nach ihrer Entnahme wurden diejenigen Gehirnproben, die auf ihren Gehalt an chlorierten Kohlenwasserstoffen untersucht werden sollten, in destilliertem Wasser ebenfalls mit dem Ultraturrax homogenisiert. (je Ansatz 0,5 - 0,7 g Gehirn-Frischgewebe in 5 ml Aqua dest.)

Das Homogenat wurde anschließend mit dem doppelten Volumen n-Hexan in einer Schüttelmaschine extrahiert (60 Minuten Phasenmischung bei 40 - 50 U/Min.). Die Phasen wurden mit der Laborzentrifuge voneinander getrennt, und die Hexanphase gaschromatographisch auf ihren Gehalt an chlorierten Kohlenwasserstoffen analysiert.

Die Wiederfindungsrate wurde dadurch bestimmt, daß zu Homogenat aus 0,6 g Gehirn steigende Mengen an Dieldrin, DDT oder Hexachlorbenzol gegeben und umgeschüttelt wurde. Anschließend wurde in gleicher Weise mit Hexan extrahiert. Die Ergebnisse der Wiederfindungsversuche sind in den Tabellen 3 - 5 aufgeführt. Bei DDT konnte im Mittel 93,4 +- 6,9 % bei Dieldrin

96,3 +- 9,0 % und beim Hexachlorbenzol 91,3 +- 6,4 % wiedergefunden werden. Es zeigte sich, daß bei allen untersuchten chlorierten Kohlenwasserstoffen die Wiederfindungsrate in dem geprüften Konzentrationsbereich konstant und nahezu vollständig blieb.

Bei allen im Ergebnisteil aufgeführten Konzentrationsangaben von Pentetrazol und den chlorierten Kohlenwasserstoffen wurden die Extraktionsverluste rechnerisch korrigiert.

DDT zugegeben	DDT wiedergefunden		n
µg	- µg -	%	
4,76	4,55 ± o,34	96,19 ± 7,14	3
9,52	9,32 ± o,48	97,89 ± 5,o4	3
19,o4	17,75 ± o,55	93,22 ± 2,88	3
38,o8	31,73 ± 1,1o	82,37 ± 2,88	3

Tab. 3 Wiederfindung von DDT aus Gehirnhomogenat

Dieldrin zugegeben ug	Dieldrin wiedergefunden		n
	-ug-	%	
1,07	1,18 ± 0,03	110,00 ± 2,80	3
3,21	3,39 ± 0,10	105,6 ± 3,11	3
4,28	3,93 ± 0,27	92,02 ± 6,30	3
8,56	8,48 ± 0,15	99,11 ± 1,75	3
13,91	13,06 ± 0,46	93,88 ± 3,30	3
17,12	14,78 ± 0,36	86,00 ± 2,10	3
21,40	18,76 ± 0,74	87,80 ± 3,45	3

Tab. 4 Wiederfindung von Dieldrin aus Gehirngewebe

Hexachlorbenzol zugegeben µg	Hexachlorbenzol wiedergefunden		n
	- µg -	%	
9,22	9,22 ± o,68	1oo ± 7,37	3
18,44	15,71 ± o,27	85,2 ± 1,46	3
36,88	37,42 ± 1,o7	93,88± 2,9o	3
73,76	65,54 ± o,49	88,68± o,66	3

Tab. 5 Wiederfindung von Hexachlorbenzol aus Gehirnhomogenat

2.4.3 Gaschromatographische Erfassung von Pentetrazol und den verwendeten chlorierten Kohlenwasserstoffen

Die gaschromatographischen Analysen wurden auf einem Gerät der Firma HEWLETT PACKARD (Modell 5750 G) durchgeführt. Das Gerät ist mit einem Flammenionisationsdetektor und einem Elektroneneinfangdetektor ausgerüstet. Es wurden gepackte Glassäulen von 2,04 m Länge und 2,8 mm innerem Durchmesser verwendet. Die Trennung erfolgte auf den Siliconphasen OV1 und OV17, die 3 %ig auf Gaschrom Q von 100 - 120 mesh aufgetragen waren. (Fertigprodukt der Firma SERVA, Heidelberg). Die Säulen wurden mit dem vorgefertigten Trägermaterial selbst gefüllt und nach den Angaben von Riedmann (1971) konditioniert. Die Analysen wurden bei folgenden Temperaturen durchgeführt: Einspritzblock 230°C, Flammenionisationsdetektor 280° C und Elektroneneinfangdetektor 300° C.

Die Säulentemperaturen waren von den zu analysierenden Substanzen abhängig. Sie betrugen bei Pentetrazol und Hexachlorbenzol 150° C und bei Dieldrin und DDT 170 - 180° C.

Der Gasfluß war wie folgt eingestellt: Trägergase: Stickstoff reinst 33 - 45 ml/min ; Brenngase für den Flammenionisationsdetektor: 100 ml/min Wasserstoff und ungefähr 500 ml Luft/Minute; der Elektroneneinfangdetektor wurde mit einem Gemisch aus 90 % Argon und 10 % Methan durchströmt (circa 150 ml/min).

Bei der gaschromatographischen Analyse von Pentetrazol mit Hilfe des Flammenionisationsdetektors werden zunehmende Pentetrazol-Mengen durch linear steigende Signale des Detektors angezeigt. (vgl. Abb. 4) Bei der Analyse der chlorierten Kohlenwasserstoffe mit Hilfe des Elektroneneinfangdetektors ist die Linearität der Detektoranzeige nur in einem begrenzten Bereich gegeben. Deshalb wurde bei jeder Meßreihe, die mit dem Elektroneneinfangdetektor zu analysieren war, vorher geprüft, ob die Detektoranzeige im gewählten Konzentrationsbereich linear ist (vgl. Abb. 5). Bei wiederholter Injektion gleicher Substanzmengen waren beim Flammenionisationsdetektor und beim Elektroneneinfangdetektor die Detektoranzeige mit einer Streubreite von 6 % reproduzierbar.

Körpereigene Substanzen,die durch die Extraktion mit erfaßt werden, störten die gaschromatographische Erfassung von Pentetrazol und Chlorkohlenwasserstoffen mit dem Elektroneneinfangdetektor und dem Flammenionisationsdetektor nicht.

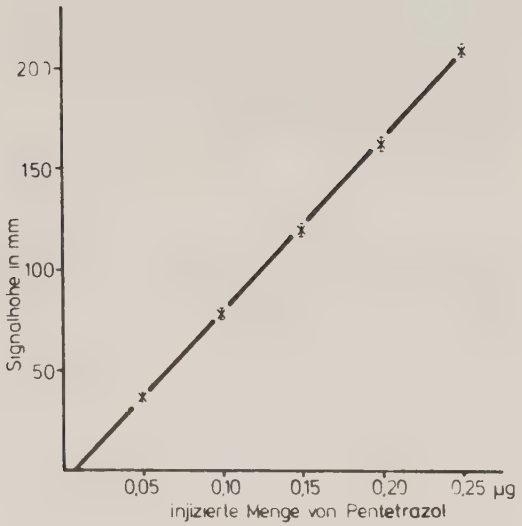


Abb.4 Erfassung steigender Mengen von Pentetrazol durch den Flammenionisationsdetektor

Die Einstellung des Gaschromatographen entspricht derjenigen in Abb. 1. Die Elektrometereinstellung war 10 x 2 .

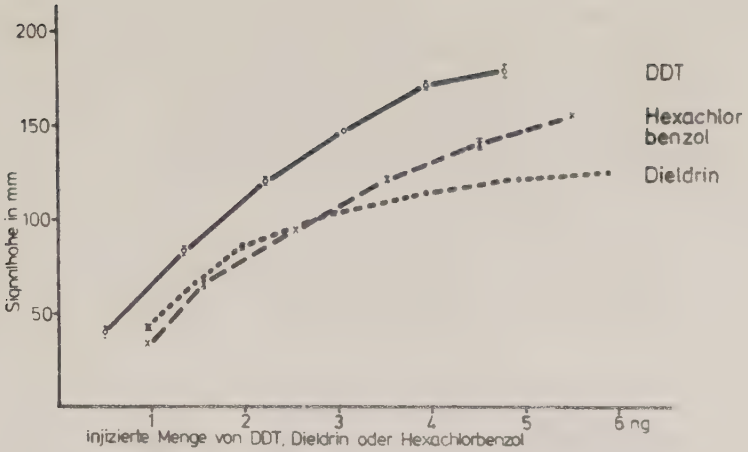


Abb. 5 Erfassung steigender Mengen von DDT, Dieldrin und Hexachlorbenzol durch den Elektroneneinfangdetektor

Einstellung des Gaschromatographen entspricht derjenigen in Abb. 2 .

2.4.4 Auswertung der Gaschromatogramme

Die Auswertung der Gaschromatogramme erfolgte über die Höhe der Detektorsignale. Dabei wurde die Höhe des Detektorsignals der zu analysierenden Probe mit einem gleichhohen Detektorsignal einer bekannten Substanzmenge verglichen und die Konzentration des gesuchten Stoffs in der Probe nach folgender Gleichung berechnet:

$$X = \frac{A \cdot B \cdot C \cdot D \cdot E}{F \cdot G \cdot H}$$

X = Substanzkonzentration in der Probe
A = Gesamtvolumen des Gewebsextraktes
B = Signalhöhe der Probe
C = Analysiertes Volumen der Eichlösung
D = Konzentration der Eichlösung
E = Korrekturfaktor zum Ausgleich des Extraktionsverlustes
F = Analysiertes Volumen des Gewebsextraktes
G = Aufgearbeitete Gewebsmenge
H = Signalhöhe der analysierten Eichlösung

2.5 Biotransformation von Pentetrazol in vitro

2.5.1 Praeparation der Leberzellfraktion

Die Biotransformation von Pentetrazol wurde an Enzympraeparationen der Leber in vitro studiert. Dabei wurden Umsatzraten bei unvorbehandelten Kontrolltieren mit Umsatzraten von Versuchstieren verglichen, die einmalig mit Dieldrin, DDT, Hexachlorbenzol oder drei Tage lang mit Phenobarbital vorbehandelt worden waren.

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet und gut ausgeblutet. Die Lebern dieser Tiere wurden rasch entnommen und sofort in eisgekühlter isotongepufferter Saccharoselösung mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator zerkleinert (4 g Frischleber und 10 ml 0,5 molare Tris-Saccharose-Lösung, Ph 7,4). Das Homogenat wurde anschließend bei 0° C 10 Minuten lang bei 10 000 U/Min (11 000 x g) in einer Sorvall-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der so gewonnene 11 000 x g Überstand wurde bei einem Teil der Untersuchungen als Enzympraeparation verwendet. Zur Sedimentierung des endoplasmatischen Retikulums wurde dieser 11 000 x g Überstand abermals bei 0° C zentrifugiert (SPINCO ULTRA-Zentrifuge, 60 Min. bei

40 000 U/Min = 105 000 x g).

Der Niederschlag, der die "Mikrosomenfraktion" enthält, sowie der Überstand (= Hyaloplasma) wurden ebenfalls als Enzympraeparation eingesetzt.

2.5.2 Zusammensetzung der Inkubationsansätze

Die Inkubationsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 5ml 14 C-Pentetrazol 10,0 mmolar (eingesetzte 14 C-Radioaktivität = 240 000 dpm/Ansatz), Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat 0,5 mmolar; Isocitrat 5,0 mmolar; MgCl2 3,0mmolar; 10 µl Isocitratdehydrogenase / Ansatz und Enzympraeparation aus 400 mg Leber. Es wurde 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Gasphase war Luft. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und durch Zugabe von 1 ml 0,5 N Perchlorsäure gestoppt. Als Leerwerte dienten Inkubationsansätze, deren Enzympraeparation vorher durch Hitze denaturiert worden war.

2.5.3 Messung der Radioaktivität im Inkubationansatz

Der denaturierte Inkubationsansatz wurde einmal mit dem doppelten Volumen Chloroform ausgeschüttelt (10 Minuten schütteln bei 40 - 50 U/Min), die Phasen in der Laborzentrifuge voneinander getrennt und nach Phasentrennung die Radioaktivitätsverteilung auf die Wasserphase und auf die Chloroformphase gemessen. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte in einem Liquid-Scintillations-Spectrometer der Firma PACKARD INSTRUMENTS (TRICARB Modell Nr. 544). Dazu wurde eine Scintillatorlösung verwendet, die nach den Angaben von PATTERSON ET AL. (1965) zusammengesetzt war: (In einem Liter Toluol wurden 4,01 g PPO = 2,5 Diphenyl-oxazol und 50,18 mg Dimethyl-POPOP = 1,4 bis 2,4 Methyl - 5 Phenyloxazolylbenzol gelöst und anschließend 2 Teile (V/V) dieser Lösung mit einem Teil Triton-X-100 (Firma SERVA, Heidelberg) gemischt.)

In 10 ml dieser Scintillatorlösung wurden jeweils 100 µl der Chloroformphase und 500 µl der Wasserphase eingebracht und im Liquidscintillationszählgerät auf ihren Radioaktivitätsgehalt untersucht. Mit Hilfe der Kanalverhältnismethode wurde die Löschung und die Zahl der Zerfälle

pro Minute in der Chloroform- und in der Wasserphase bestimmt.

2.5.4 Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Enzympraeparationen

Zur Berechnung der Stoffwechselaktivität der eingesetzten Leberzellfraktionen wurde von diesen der Stickstoffgehalt bestimmt. Je 0,5 ml der eingesetzten Enzympraeparation (11 000 x g Überstand, Hyaloplasma bzw. Mikrosomenfraktion aus je 200 mg Frischleber) wurden mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz von Selenoxyd verascht und ihr Stickstoffgehalt nach der Methode von KJELDAHL bestimmt.

2.5.5 Berechnung der Metabolisierung von Pentetrazol in vitro

Wird radioaktives Pentetrazol mit einer hitzedenaturierten Leberzellfraktion inkubiert und der Inkubationsansatz anschließend mit Chloroform extrahiert, so verteilt sich die Radioaktivität zu 95,2 % +- 0,85 % (n = 16) auf die Chloroformphase und zu 4,8 +- 0,8 % (n = 16) auf die Wasserphase.

Wird dagegen Pentetrazol mit aktiven Leberenzymen inkubiert, so ist nach Ablauf der Inkubationszeit eine Vermehrung der Radioaktivität in der Wasserphase und eine Verringerung der Radioaktivität in der Chloroformphase festzustellen. Diese Biotransformation von lipophiler Radioaktivität in hydrophile Radioaktivität zeigt eine Biotransformation von Pentetrazol an. Aus der Menge der Radioaktivität, die während der Inkubation wasserlöslich wurde, aus der gesamten eingesetzten Radioaktivität, sowie aus dem Stickstoffgehalt der Enzympräparation ließ sich errechnen, wieviel Pentetrazol pro Zeiteinheit biochemisch umgewandelt wurde.

2.6 Statistik

In den Ergebnissen sind stets die arithmetrischen Mittelwerte und die Standardabweichung (S) angegeben. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach dem t-Test von STUDENT.
Die lineare Regression wurde auf einer Rechenmaschine (Typ SR - 51 A der Firma TEXAS INSTRUMENTS) nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet.

3.1 Verhalten der Versuchstiere nach einmaliger Applikation von Aldrin, Dieldrin, Endrin, DDT und Hexachlorbenzol

Dieldrin bewirkte bei den Versuchstieren bereits eine Stunde nach intraperitonealer Applikation von 30 mg/kg eine erhöhte Erregbarkeit und Schreckhaftigkeit sowie einen feinschlägigen Tremor. Wenige Stunden später bekamen einige von ihnen klonische Krampfanfälle, die sich über Minuten hinzogen und durch geringfügige äußere Reize, wie Berührung und Geräusche erneut ausgelöst werden konnten.

Bei einzelnen Tieren traten derartige Krampfanfälle bis zu 12 Stunden nach der Applikation auf. Die gesteigerte Erregbarkeit klang erst in den nachfolgenden Tagen langsam wieder ab. In den ersten Tagen nach der Dieldringabe fiel bei den Tieren ein ungepflegtes und oft feuchtes Fell auf. Außerdem blieben sie gegenüber den unbehandelten Kontrollen in der Entwicklung ihres Körpergewichtes etwas zurück. (s. Tab. 6) Diesen Rückstand hatten sie 9 Tage nach der Vorbehandlung noch nicht ganz wieder aufgeholt. Während der Beobachtungszeit (vor allem 3 - 7 Tage nach der Dieldrin-Applikation) verstarben einige Tiere. Ihre Kadaver wurden von den überlebenden Tieren, die sich im gleichen Käfig befanden, gefressen. Es entstand der Eindruck, den Tieren würde etwas in der Nahrung (z.B. Protein) fehlen. Ihnen wurde deshalb bereits unmittelbar nach der Injektion von Dieldrin Rinder-

pansen ad libitum angeboten; er wurde von den Tieren angenommen. Dabei zeigte sich, daß diejenigen Tiere, denen Rinderpansen angeboten worden war, eine deutlich geringere Letalitätsquote aufwiesen. Während von 24 Tieren, die keinen Pansen erhalten hatten, zwischen dem 6. und 9. Tag nach Vorbehandlung 7 Tiere verstarben (29 %), waren es im gleichen Zeitraum von 32 Versuchstieren, die Rinderpansen bekommen hatten, nur 3 Tiere (9 %). Die Zugabe von Rinderpansen verhinderte allerdings nicht, daß auch diese Tiere in den ersten 9 Tagen nach der Dieldrinapplikation etwas weniger zunahmen als unvorbehandelte Kontrollen. Nach i. p. Injektion kleiner Dosen von Dieldrin (1 - 15 mg/kg) traten mit Verringerung der applizierten Dosis auch geringere Vergiftungszeichen auf. Nach Applikation von 1 bzw. 7,5 mg/kg Dieldrin waren keine Krampfanfälle mehr zu beobachten. Die Tiere waren nur mäßig erregt.

Aldrin wurde bei gleicher Dosierung wie Dieldrin (ebenfalls 30 mg/kg intraperitoneal) von den Tieren besser vertragen. Eine vermehrte Erregbarkeit und Schreckhaftigkeit waren wohl zu beobachten, jedoch wesentlich geringer ausgeprägt. Auch das Aussehen der Versuchstiere war unauffälliger. Ihr Fell war trocken, gesäubert und glatt. Klonische Krampfanfälle konnten bei diesen Tieren nicht gesehen werden. Von den vorbehandelten Tieren ist keines verstorben. Bei 16 Versuchstieren blieb allerdings in

Tag nach Vorbehandlung	Zahl der vorbehandelten Versuchstiere	Körpergewicht der Tiere am Versuchstag		
		n	g	% der Kontrollen
Kontrollen	2o	2o	144 ± 6	1oo %
3 Std.	6	6	143 ± 6	99 %
1.	6	6	132 ± 9	92 %
3.	6	5	127 ±12	88 %
4.	6	3	134 ±14	93 %
5.	6	5	128 ± 9	89 %
6.	14	12	131 ±1o	91 %
7.	14	12	133 ± 9	92 %
8.	14	12	132 ± 8	92 %
9.	14	9	137 ±1o	95 %

Tab. 6 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere nach einmaliger Vorbehandlung mit Dieldrin

Dieldrin: 3o mg/kg, o.6 %ig in Rapsöl intraperitoneal. Kontrolltiere erhielten die entsprechende Menge Rapsöl.

Verglichen wird das Gewicht der Kontrollen mit dem Gewicht der vorbehandelten Versuchstiere, die 3 Stunden bis 9 Tage zuvor eine einmalige Dosis von Dieldrin erhielten.

den ersten 4 Tagen nach der Aldringabe die Entwicklung des Körpergewichtes etwas unter denjenigen unvorbehandelter Kontrolltiere zurück. Während die Kontrollen ein Körpergewicht von 92 ± 5 gr (n = 8) aufwiesen, betrug das Körpergewicht bei Tieren, die einen Tag vorher Aldrin bekommen hatten, 88 ± 7 gr (n = 8) und bei denen, die Aldrin 4 Tage vorher injiziert bekommen hatten, 80 ± 10 mg (n = 8).

Endrin wurde wegen der in der Literatur angegebenen höheren akuten Toxizität bei Ratten (KLIMMER 1963, GAINES 1960) in einer geringeren Dosis (5 mg/kg) einmalig intraperitoneal injiziert. Nach dieser Dosis traten, vergleichbar mit Aldrin, lediglich eine deutliche Unruhe und eine erhöhte Schreckhaftigkeit auf. Krampfanfälle wurden nicht beobachtet. Die Tiere wiesen ein gepflegtes, trockenes Fell auf. Trotzdem verstarben bis zum 4. Tag nach der Vorbehandlung von 8 vorbehandelten Versuchstieren 2 . Die Entwicklung der Körpergewichte blieb bei den mit Endrin vorbehandelten Versuchstieren in den ersten 4 Tagen nach der Vorbehandlung ebenfalls etwas gegenüber derjenigen unvorbehandelter Kontrollen zurück. Gegenüber unvorbehandelten Kontrollen mit einem Körpergewicht von 92 ± 5 g (n = 11), zeigten Tiere, die 24 Stunden vorher Endrin bekommen hatten, ein Körpergewicht von 83 ± 10 g (n = 8) und diejenigen, die 4 Tage vorher Endrin erhielten, ein Körpergewicht von 82 ± 11 g (n = 6).

pp - DDT sowie o.-p.-DDT wurde nach einmaliger Intraperitonaler Applikation von 200 mg/kg von allen Tieren toleriert. Beim Verhalten und Aussehen der vorbehandelten Tiere war kein Unterschied zu den unvorbehandelten Kontrolltieren zu erkennen. Erhöhte Körpertemperaturen konnten 6 und 10 Stunden nach der Injektion rektal nicht gemessen werden. Es wurden außerdem keine Krämpfe beobachtet. In den ersten 12 - 18 Stunden nach Applikation, war lediglich ein feinschlägiger Ruhe-Tremor sichtbar. Keines der mit DDT vergifteten Tiere (n = 40) verstarb innerhalb von 7 Tagen nach der Vorbehandlung. Die Körpergewichte der vorbehandelten Versuchstiere unterschieden sich im genannten Versuchszeitraum nicht von denjenigen unvorbehandelter Kontrollen. (siehe Tab. 7)

Hexachlorbenzol bewirkte im Dosierbereich von 50 - 400 mg/kg akut keine sichtbaren Veränderungen im Verhalten und Aussehen der Versuchstiere. Deren Fell war stets sauber, trocken und glatt. Haarausfall und Ulcerationen der Haut wurden bis zu 21 Tagen nach der Applikation nicht gesehen.

Die Körpergewichte Hexachlorbenzol-vergifteter Tiere wichen bis zu 9 Tagen nach einmaliger Injektion von 360 mg/kg Hexachlorbenzol Körpergewicht nicht von denjenigen unvorbehandelter Kontrollen ab. (siehe Tab. 8)

Während des 9-tägigen Beobachtungszeitraumes verstarb keines der mit Hexachlorbenzol behandelten Tiere.

Tag nach Vorbehandlung	Zahl der vorbehandelten Versuchstiere	Körpergewicht der Tiere am Versuchstag		
		n	g	% der Kontrollen
Kontrollen	9	9	123 ± 7	1oo %
1.	8	8	123 ± 5	1oo %
2.	8	7	124 ± 5	1o1 %
3.	8	8	122 ± 7	99 %
5.	8	8	119 ± 7	97 %
7.	8	8	127 ± 7	1o3 %

Tab. 7 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere nach einmaliger Vorbehandlung mit DDT

DDT: 2oo mg/kg 2 %ig in Rapsöl intraperitoneal. Kontrolltiere erhielten die entsprechende Menge Rapsöl.

Verglichen wird das Gewicht der Kontrollen mit dem Gewicht der vorbehandelten Versuchstiere, die 24 Stunden bis 7 Tage zuvor eine einmalige Dosis von DDT erhielten.

Tag nach Vorbehandlung	Zahl der vorbehandelten Versuchstiere	Körpergewicht der Tiere am Versuchstag		
		n	g	% der Kontrollen
Kontrollen	1o	1o	132 ± 6	1oo %
1.	1o	1o	126 ± 5	95 %
3.	1o	1o	137 ± 6	1o4 %
5.	1o	1o	136 ± 8	1o3 %
7.	1o	1o	137 ± 5	1o4 %
9.	1o	1o	137 ± 6	1o4 %

Tab. 8 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere nach einmaliger Vorbehandlung mit Hexachlorbenzol

Hexachlorbenzol: 36o mg/kg, 1 %ig in Rapsöl, 5o % der Dosis intraperitoneal, 5o % oral. Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge Lösungsmittel.
Verglichen wird das Gewicht der Kontrollen mit dem Gewicht der vorbehandelten Versuchstiere, die 24 Stunden bis 9 Tage zuvor eine einmalige Dosis von Hexachlorbenzol erhielten.

3.2 Convulsive Wirksamkeit von Pentetrazol nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit Aldrin, Dieldrin, Endrin, DDT oder Hexachlorbenzol

3.2.1 Wirkung von Aldrin, Endrin und Dieldrin

Nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Aldrin, Endrin oder Dieldrin, wurden gleichartige Vergiftungszeichen im Sinne einer Erregung des Nervensystems festgestellt. Es war deshalb zu erwarten, daß diese Substanzen auch einen gleichartigen Einfluß auf die Empfindlichkeit der Versuchstiere gegenüber Pentetrazol ausüben würden.

Es zeigte sich tatsächlich, daß eine einmalige Injektion der genannten Substanzen (vgl. Abb. 6) sowohl am 1. als auch am 4. Tag nach der Vorbehandlung bei allen Versuchstieren eine deutliche Sensibilisierung gegenüber der krampfauslösenden Wirkung von Pentetrazol hervorruft. 24 Stunden nach Vorbehandlung führte Dieldrin zu einer stärkeren Sensibilisierung der Versuchstiere gegenüber der krampfauslösenden Wirkung von Pentetrazol als Aldrin nach gleicher Dosierung. Dieses Verhältnis war am 4. Tag nach Vorbehandlung umgekehrt. Jetzt bewirkte Aldrin eine stärkere Senkung der krampfauslösenden Dosis als Dieldrin.

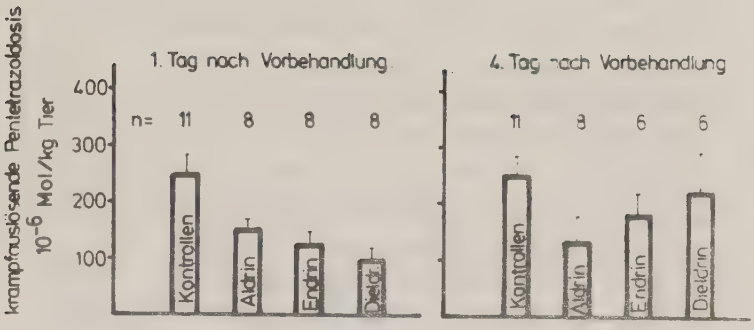


Abb. 6 Einfluß einer einmaligen Applikation von Dieldrin, Endrin oder Aldrin auf die krampfauslösende Wirkung von Pentetrazol

Vorbehandlung: Dieldrin 30 mg/kg i.p.; Aldrin 30 mg/kg i.p.; Endrin 5 mg/kg i.p.

24 Stunden bzw. 4 Tage vor Bestimmung der krampfauslösenden Pentetrazol-Dosis.

Der Einfluß einer etwa sechsmal kleineren Dosis von Endrin auf die convulsive Wirkung von Pentetrazol lag an beiden Versuchstagen zwischen demjenigen von Aldrin und Dieldrin. Er war am 1. Tag nach Vorbehandlung deutlicher ausgeprägt als am 4. Tag.

Da alle geprüften Cyclodien-Insektizide in gleicher Weise die Empfindlichkeit der Versuchstiere gegenüber der krampfauslösenden Wirkung von Pentetrazol erhöhen, wurden spätere Untersuchungen nur noch mit Dieldrin durchgeführt.

3.2.2 Wirkung einer Einzeldosis von Dieldrin, DDT oder Hexachlorbenzol über die Zeit

In Abb. 7 sind Dauer und Intensität des Einflusses einer einmaligen Applikation von Dieldrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol auf die krampfauslösende Wirkung von Pentetrazol dargestellt.

Während bei unvorbehandelten Kontrolltieren eine mittlere Pentetrazoldosis von 226,9 +- 27,6 /umol/kg (n = 110) einen generalisierten Krampfanfall auslöste, wurde diese Dosis durch die Vorbehandlung der Versuchstiere mit den drei chlorierten Kohlenwasserstoffen unterschiedlich beeinflußt.

Dieldrin bewirkte, wie bereits die Vorversuche (3, 2, 1) gezeigt hatten, eine Sensibilisierung der Versuchstiere gegenüber Pentetrazol. Diese äußerte sich darin, daß mit Dieldrin vorbehandelte Versuchstiere nach Zufuhr kleinerer Dosen von Pentetrazol mit Krampfanfällen reagierten, als unvorbehandlete Kontrollen. Die erhöhte Empfindlichkeit der Tiere gegenüber Pentetrazol war bereits drei Stunden nach der Dieldrininjektion nahezu maximal ausgeprägt. Bis zu 24 Stunden nach der Dieldringabe betrug die krampfauslösende Pentetrazol-Dosis nur ein Drittel derjenigen Dosis, bei der unvorbehandelte Kontrollen mit

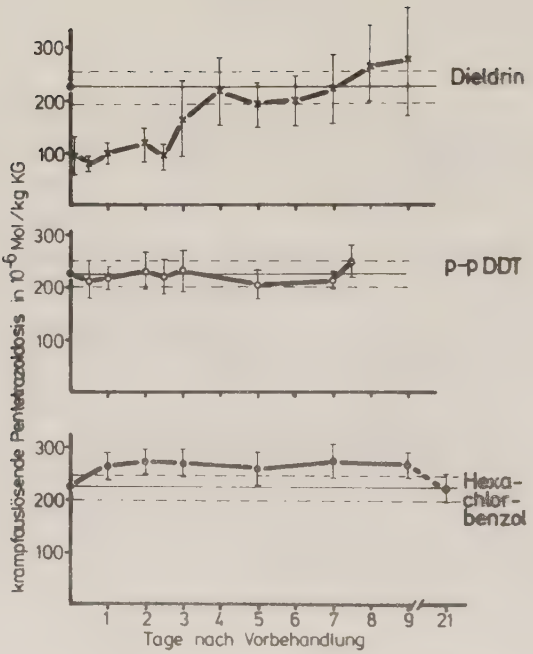


Abb. 7 Veränderung der krampfauslösenden Pentetrazoldosis bis zu 20 Tagen nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit Dieldrin, p,p-DDT oder Hexachlorbenzol

Tiere: weiblich, 90-120g, ad libitum ernährt
Pentetrazol: 0,8%ige wässrige Lösung, intravenös, 0,53 ml/min
Chlorkohlenwasserstoff: Dieldrin 30 mg/kg i.p.
p,p-DDT 200 mg/kg i.p.
Hexachlorbenzol 360 mg/kg

Angegeben sind Mittelwerte aus 4 - 12 Einzelversuchen mit Standardabweichung.

einem Krampfanfall reagierten. Im Zeitraum vom 1. - 6. Tag nach der Dieldringabe bildete sich die Sensibilisierung gegenüber Pentetrazol wieder zurück.

Zwischen dem 7. und 9. Tag unterschieden sich Dieldrinvorbehandelte Tiere nicht mehr von den unvorbehandelten Kontrollen.

P,p-DDT bewirkte nach einmaliger Applikation an Versuchstieren keine erkennbare Veränderung in ihrer Reaktion auf eine krampfauslösende Pentetrazoldosis. Während des gesamten Beobachtungszeitraums von 0,5 - 7 Tagen nach der DDT-Injektion lösten etwa 220 µMol Pentetrazol/kg Tier sowohl bei diesen Tieren als auch bei den unvorbehandelten Kontrollen einen generalisierten Krampfanfall aus.

Hexachlorbenzol wurde im Vergleich zu Dieldrin und p,p-DDT in einer hohen Dosis verabreicht. In dieser Dosis verursachte es im Gegensatz zu Dieldrin keine Sensibilisierung gegenüber der krampfauslösenden Wirkung von Pentetrazol, sondern eine deutlich verminderte Empfindlichkeit der Tiere gegenüber Pentetrazol. Im Zeitraum von 24 Stunden bis zu 9 Tagen nach der Vorbehandlung, war eine um etwa 20 % höhere Pentetrazoldosis notwendig, um bei diesen Tieren einen Krampfanfall auszulösen. Am 21. Tag nach der Vorbehandlung unterschieden sich Hexachlorbenzol-vorbehandelte Tiere nicht mehr von unvorbehandelten Kontrolltieren.

3.2.3 Wirkung steigender Dosen von Dieldrin, DDT und Hexachlorbenzol zu einem Zeitpunkt

Innerhalb der ersten beiden Tage nach einmaliger Gabe von Dieldrin oder Hexachlorbenzol wurde die größte Beeinflussung der krampfauslösenden Pentetrazol-Dosis beobachtet. Deshalb wurde in diesem Zeitraum geprüft, bei welcher Dosierung der chlorierten Kohlenwasserstoffe erstmals eine Beeinflussung der Pentetrazolwirkung zu beobachten ist, und welchen Effekt steigende Dosen von Dieldrin, DDT und Hexachlorbenzol bewirken. Das Ergebnis ist in Abb..8 dargestellt.

Es zeigte sich, daß Dieldrin in der Dosierung von 1 mg/kg keine Veränderung der Krampfschwelle hervorruft, Dosen über 2 mg/kg jedoch schon zu einer deutlichen Sensiblisierung gegenüber der krampfauslösenden Wirkung von Pentetrazol führen. Eine weitere Steigerung der Dieldrindosen führte auch zu einer weiteren Zunahme der Empfindlichkeit der Tiere gegenüber Pentetrazol. Wegen der hohen akuten Toxität von Dieldrin konnten höhere Dosen als 30 mg/kg nicht mehr getestet werden. Bei 45 mg Dieldrin/kg z.B. waren die Tiere so stark erregt, daß äußere Reize bereits klonische Krampfanfälle auslösen konnten.

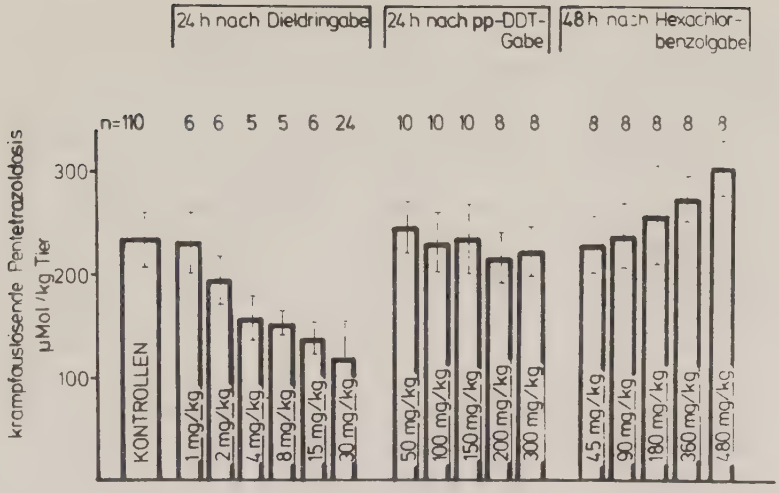


Abb. 8 Einfluß steigender Dosen von Dieldrin, pp-DDT und Hexachlorbenzol auf die krampfauslösende Dosis von Pentetrazol

Tiere: 90-120 g, weiblich, ad libitum ernährt ; Applikation der Chlorkohlenwasserstoffe und von Pentetrazol (vgl. Methode).

Die Angaben in den Säulen geben die in der Vorbehandlung applizierte Dosis der Chlorkohlenwasserstoffe wieder. Die Kontrollwerte der drei Versuche wurden zusammengefaßt. Angaben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Obwohl p,p-DDT im Vorversuch keinen Einfluß auf die krampfauslösende Pentetrazol-Dosis erkennen ließ, wurden noch drei niedrigere und eine höhere Dosis untersucht. Auch hier zeigte sich 24 Stunden nach der Vorbehandlung mit Dosen von 50-300 mg p,p-DDT/kg Tier keinerlei verwertbarer Unterschied zwischen DDT-vergifteten Tieren und unvorbehandelten Kontrollen.

Ergänzende Experimente, in denen die stereoisomere Verbindung zum p,p-DDT, nämlich das o,p-DDT, eingesetzt wurde, erbrachten ebenfalls keine neuen Gesichtspunkte. Wie die Werte in Tab. 9 zeigen, reagierten Tiere, die 24 Stunden bzw. 4 Tage zuvor mit 200 mg/kg p,p-DDT oder o,p-DDT vergiftet worden waren, bei annähernd der gleichen Pentetrazol-Dosis mit einem generalisierten Krampfanfall.

Hexachlorbenzol bewirkte (s. Abb. 8) in Abhängigkeit von der applizierten Dosis eine leichte antikonvulsive Wirkung gegenüber Pentetrazol.
Die Dosis-Wirkungsbeziehung verlief allerdings sehr flach. Während 45 bzw. 90 mg/kg Hexachlorbenzol keine Veränderung in der Pentetrazol-Empfindlichkeit der Tiere hervorriefen, bewirkten 180 mg/kg Hexachlorbenzol eine leichte Anhebung der Krampfschwelle gegenüber unvorbehandelten Kontrollen.
Nach Gabe von 480 mg Hexachlorbenzol/kg war die krampfauslösende Pentetrazol-Dosis im Vergleich zu

Applizierte Substanz	n	krampfauslösende PTZ-Dosis µMol/kg	
		24 Std. n.Vorbeh.	4 Tage n. Vorbeh.
Kontrollen	8	255,1 ± 27,5	255,1 ± 27,5
p,p-DDT	10	276,1 ± 30,4	287,2 ± 38,4
o,p-DDT	10	257,6 ± 43,3	248,9 ± 32,6

Tab. 9

Krampfauslösende Pentetrazoldosis 24 Std. und 4 Tage nach einmaliger intraperitonealer Injektion von 200mg/kg o,p-DDT bzw. p,p-DDT

Einzelheiten s. Methodik; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

unvorbehandelten Kontrolltieren um etwa 30 % - 40 % erhöht.
Da sich Hexachlorbenzol nur etwa 1%ig in Rapsöl lösen ließ, konnte den Versuchstieren bei einmaliger Vorbehandlung keine größere Hexachlorbenzol-Dosis als die angegebene Menge zugeführt werden.

3.3 Einfluß von Dieldrin, DDT und Hexachlorbenzol auf die Penetration von Pentetrazol in das Gehirn

Die veränderte Reaktion der Versuchstiere auf die krampfauslösende Pentetrazol-Wirkung (höhere Empfindlichkeit gegenüber Pentetrazol bei Dieldrin-vergifteten Versuchstieren und erniedrigte Empfindlichkeit bei mit Hexachlorbenzol-vorbehandelten, könnte darauf beruhen, daß die chlorierten Kohlenwasserstoffe die Erregbarkeit des Zentralnervensystems durch Pentetrazol verändern. Sie könnte aber auch darauf zurückzuführen sein, daß die chlorierten Kohlenwasserstoffe die Permeation des Pentetrazol über die Blut-Hirnschranke zu seinen Rezeptoren im Zentralnervensystem beeinflußt.

Deshalb wurde untersucht, welche Konzentrationen von Pentetrazol im Gehirn bei unvorbehandelten Kontrollen sowie bei Versuchstieren, die mit chloriertem Kohlenwasserstoff vergiftet worden waren, die generalisierten Krampfanfälle auslösen können.

3.3.1 Wirkung einer einmaligen Gabe von Dieldrin, DDT und Hexachlorbenzol über die Zeit

Dieldrin-vergiftete Versuchstiere reagierten empfindlicher auf die krampfauslösende Wirkung von Pentetrazol als unvorbehandelte Kontrollen. Während der generalisierten Krampfanfälle wurden auch erheblich niedrigere Pentetrazol-Konzentrationen im Zentralnervensystem gefunden. (siehe Abb. 9) In den ersten 48 Stunden nach der Dieldrinvorbehandlung reagierten die Tiere bei etwa der Hälfte derjenigen Pentetrazol-Konzentrationen im Gehirn, die bei unvorbehandelten Kontrollen einen Krampf auslösten. Im Zeitraum zwischen dem 2. und 7. Tag nach Vorbehandlung gleicht sich die krampfauslösende Pentetrazol-Konzentration im Gehirn wieder an diejenige der unvorbehandelten Kontrollen an. Zwischen dem 7. und 9. Tag nach der Vorbehandlung ist die krampfauslösende Pentetrazol-Konzentration im Gehirn bei vorbehandelten und nicht vorbehandelten Versuchstieren annähernd gleich.

DDT bewirkte nach einmaliger Applikation keine signifikante Veränderung der Empfindlichkeit des Zentralnervensystems gegenüber Pentetrazol. Im Beobachtungszeitraum von 0,5 - 7 Tagen reagierten DDT-vergiftete Tiere wie auch unvorbehandelte Kontrollen bei annähernd der gleichen Pentetrazolkonznetration im Gehirn mit einem generalisierten Krampfanfall.

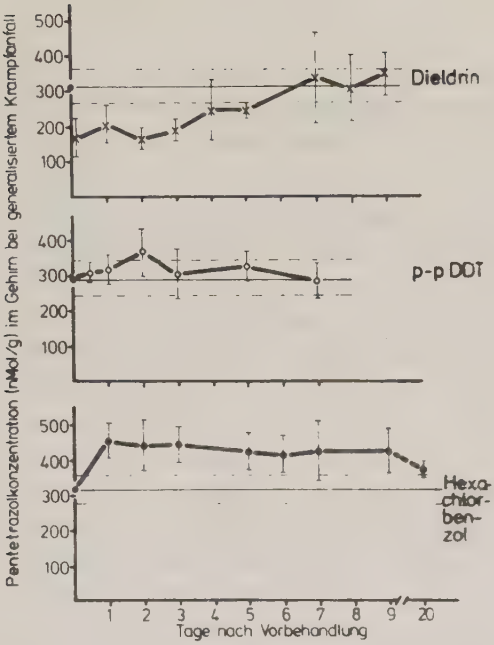


Abb. 9 Veränderungen der krampfauslösenden Konzentration von Pentetrazol im Gehirn bis zu 20 Tagen nach einmaliger Applikation von Dieldrin, p,p-DDT oder Hexachlorbenzol

Tiere: 90-120 g, ad libitum ernährt

Pentetrazol: 0,8%ig in physiologischer Kochsalzlösung

Chlorkohlenwasserstoffe: Dieldrin 30 mg/kg i.p.
p,p-DDT 200 mg/kg i.p.
Hexachlorbenzol 360 mg/kg

Die Gehirne der Versuchstiere wurden zu Beginn des generalisierten Krampfanfalles entnommen und auf ihren Gehalt an Pentetrazol untersucht. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung von 4-12 Einzelversuchen.

Hexachlorbenzol bewirkte dagegen eine deutliche Abnahme der Empfindlichkeit des Zentralnervensystems für die krampfauslösende Wirkung von Pentetrazol. Diese kommt darin zum Ausdruck, daß zwischen dem 1. und 20. Tag nach einmaliger Hexachlorbenzol-Applikation die vorbehandelten Versuchstiere im Gegensatz zu unvorbehandelten Kontrollen, erst bei einer höheren Pentetrazol-Konzentration im Zentralnervensystem ein generalisierter Krampfanfall ausgelöst wurde. Die Erhöhung der Pentetrazol-Konzentration im Gehirn, die zum Auslösen eines Krampfanfalles notwendig war, betrug 24 Stunden nach der Vorbehandlung etwa 50 % mehr als bei den Kontrollen und fiel bis zum 9. Tag nach Vorbehandlung nur unwesentlich ab. Am 20. Tag nach Vorbehandlung benötigten die vorbehandelten Versuchstiere immer etwa 20 % höhere Konzentrationen von Pentetrazol im Gehirn als unvorbehandelte Kontrollen.

3.3.2 Wirkung steigender Dosen von Dieldrin, DDT und Hexachlorbenzol zu einem Zeitpunkt

Die gesteigerte Empfindlichkeit Dieldrin-vorbehandelter Versuchstiere gegenüber Pentetrazol ist nicht nur bei der hohen Dosis von 30 mg/kg zu beobachten, sie ist auch nach Applikation wesentlich kleinerer Dieldrindosen nachweisbar. Dieses kommt in einer Dosis-Wirkungs-Studie, die 24 Stunden nach Applikation einer Dieldrin-Dosis von 4 - 30 mg/kg durchgeführt wurde, deutlich zum Ausdruck. (siehe Abb. 10) Es zeigte sich, daß nach Injektion steigender Dosen von Dieldrin die Versuchstiere bei immer kleiner werdenden Pentetrazol-Konzentrationen im Zentralnervensystem mit einem Krampfanfall reagieren. Dieldrin führt also dosisabhängig zu einer Sensibilisierung des Zentralnervensystems gegenüber Pentetrazol.

Vergleichbar durchgeführte Versuche mit verschiedenen DDT-Dosierungen zeigten (siehe Abb. 10), daß sowohl bei vorbehandelten Versuchstieren als auch bei unvorbehandelten Kontrollen annähernd die gleichen Pentetrazol-Konzentrationen im Zentralnervensystem einen Krampfanfall auslösen.

Hexachlorbenzol dagegen bewirkte bei steigender Dosierung eine Zunahme der krampfauslösenden Pentetrazol-Konzentrationen im Gehirn. (siehe Abb. 10) Während 180 mg/kg zu einem leichten Anstieg der krampfauslösenden Pentetrazol-Konzentration von

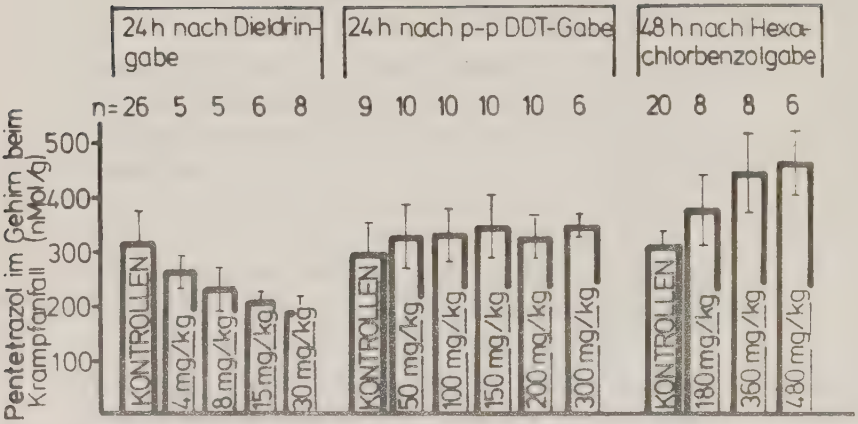


Abb. 10 Einfluß steigender Dosen von Dieldrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol auf diejenige Konzentration von Pentetrazol im Gehirn, die einen generalisierten Krampfanfall auslöst

Tiere : 90-120 g, weiblich, ab libitum ernährt; Applikation der Chlorkohlenwasserstoffe und von Pentetrazol (vgl. Methoden).
Die Angaben in den Säulen geben die in der Vorbehandlung applizierte Dosis der Chlorkohlenwasserstoffe wieder. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

etwa 20 % führten, betrug diese Erhöhung nach 480 mg/kg etwa 50 %. Dies deutet darauf hin, daß Hexachlorbenzol in zunehmender Dosis die Empfindlichkeit des Zentralnervensystems für Pentetrazol vermindern kann.

3.4 Verhalten von Dieldrin, DDT und Hexachlorbenzol im Zentralnervensystem der Versuchstiere

3.4.1 Konzentrationsänderungen nach einmaliger Applikation

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, daß die einmalige Vorbehandlung der Versuchstiere mit chlorierten Kohlenwasserstoffen die Empfindlichkeit des Zentralnervensystems gegenüber Pentetrazol sowohl erhöhen als auch vermindern kann. In weiteren Untersuchungen wurde nun geprüft, welche Konzentrationen der chlorierten Kohlenwasserstoffe sich zu denjenigen Zeiten im Zentralnervensystem befinden, zu denen die beschriebenen Veränderungen der Pentetrazol-Empfindlichkeit registriert wurden.

Dieldrin wurde 24 Stunden nach Applikation in höchster Konzentration im Zentralnervensystem angetroffen. Im Gehirn, das etwa 1,5 % des Körpergewichtes ausmacht, fanden sich zu diesem Zeitpunkt etwa 0,3 % der applizierten Dieldrindosis wieder. (siehe Abb. 11) Diese Konzentration fällt in den beiden folgenden Tagen um etwa 20 % ab. Im Zeitraum zwischen dem 3. und 6. Tag kommt es jedoch zu einer rascheren Konzentrationsabnahme auf etwa 30 %, und bis zum 9. Tag nach Applikation auf etwa 15 % der Höchstwerte.

DDT hatte bereits 12 Stunden nach intraperitonealer Injektion seine höchste Konzentration im Zentral-

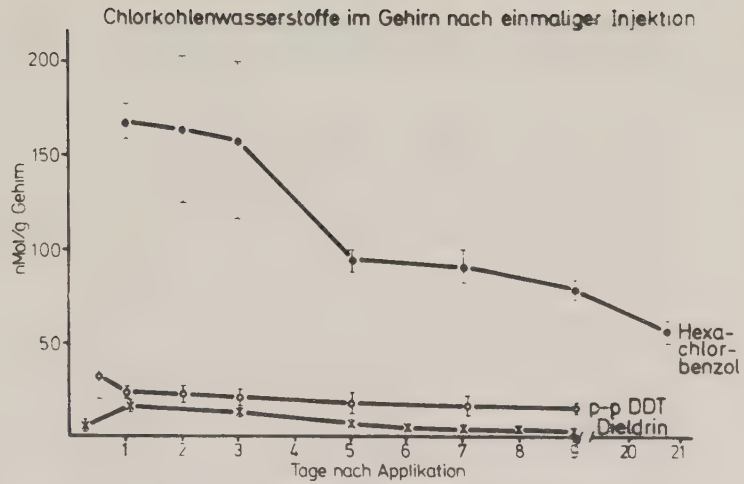


Abb. 11 Chlorkohlenwasserstoffkonzentrationen im Gehirn nach einmaliger intraperitonealer Applikation

Dosierung: Dieldrin 30 mg/kg = 79 µMol/kg
p,p-DDT 200 mg/kg = 621 µMol/kg
Hexachlorbenzol 360 mg/kg = 1263 µMol/kg

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils 4-12 Einzelversuchen.

nervensystem erreicht. (siehe Abb. 11) Diese Konzentration fiel in den beiden folgenden Tagen um 10 - 15 % ab. Am 7. Tag nach Vorbehandlung konnten noch 50 % derjenigen Konzentration im Gehirn gemessen werden, die sich dort 24 Stunden nach Verabreichung befanden.

Bei Hexachlorbenzol wurden, vergleichbar mit den anderen untersuchten chlorierten Kohlenwasserstoffen, höchste Konzentrationen im Gehirn 24 Stunden nach Applikation der Substanz gemessen. (siehe Abb. 11)
Während sich am 2. und 3. Tag nach der Applikation nur ein geringer Konzentrationsabfall feststellen ließ, kam es zwischen dem 3. und 5. Tag zu einem rascheren Abfall auf etwa 50 % bis 60 % der Höchstwerte. Im Zeitraum zwischen dem 5. - 9. Tag hielten sich die Konzentrationen in annähernd gleicher Höhe. Bei Versuchsende, am 20. Tag nach der Vorbehandlung, betrugen die Hexachlorbenzol-Konzentrationen im Gehirn immer noch etwa 30 % derjenigen des ersten Versuchstages.

3.4.2 Konzentrationen nach Applikation steigender Dosen

Nach Applikation steigender Dosen von Dieldrin, pp-DDT oder Hexachorbenzol fanden sich in den Gehirnen der Versuchstiere nach 24 Stunden Konzentrationen der genannten Stoffe, welche die vorher verabreichte Dosis wiederspiegeln. (siehe Abb. 12)

Bei allen untersuchten Stoffen konnte durch Verdoppelung und Verdreifachung der Dosis auch annähernd eine Verdoppelung und Verdreifachung der Konzentrationen dieser Stoffe im Zentralnervensystem erreicht werden.

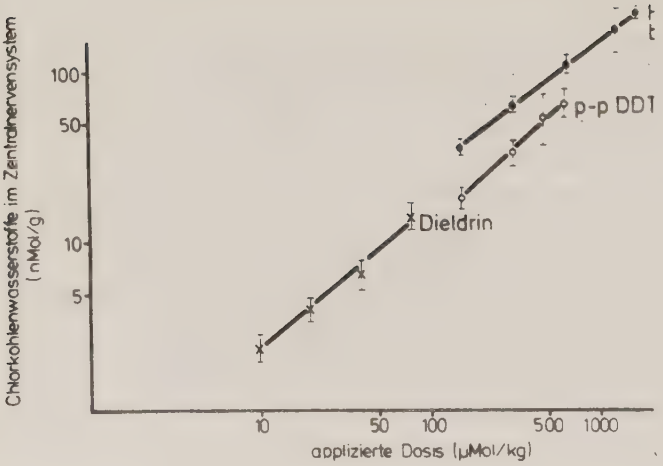


Abb. 12 Chlorkohlenwasserstoffkonzentrationen im Gehirn 24 Stunden nach Applikation von Dieldrin und p,p-DDT sowie 48 Stunden nach Gabe von Hexachlorbenzol

Dosierung: Dieldrin 10 bis 80 µMol/kg i.p.
p.p-DDT 155 bis 620 µMol/kg oral
Hexachlorbenzol 158 bis 1690 µMol/kg i.p.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 5-10 Einzelversuchen.
Zur besseren Darstellung wurde die Dosis-Konzentrationsbeziehung in doppelt logarithmischem Maßstab aufgetragen.

3.4.3 Beziehung zwischen Chlorkohlenwasserstoffkonzentration und krampfauslösenden Konzentrationen von Pentetrazol im Gehirn

Anhand der vorangehend ermittelten Daten wurde die Frage geprüft, welche Beziehung besteht zwischen den Konzentrationen von DDT, Dieldrin oder Hexachlorbenzol im Gehirn und denjenigen Konzentrationen von Cardiazol, die notwendig sind, um einen Krampfanfall auszulösen.

24 Stunden nach Applikation von Dieldrin und DDT bzw. 48 Stunden nach einmaliger Gabe von Hexachlorbenzol ergab sich folgendes Bild: (Abb. 13) (a)

Es besteht eine statistisch gesicherte Beziehung zwischen den Dieldrinkonzentrationen im Gehirn einerseits und den krampfauslösenden Pentetrazol-Konzentrationen im Gehirn andererseits. Mit Zunahme der Dieldrin-Konzentrationen im Gehirn nahmen diejenigen Pentetrazol-Konzentrationen im Gehirn ab, die zu Beginn des Krampfanfalles in diesem Organ gefunden werden konnten.

Bei einem Vergleich der Konzentrationen von pp-DDT mit den krampfauslösenden Konzentrationen von Pentetrazol ergab sich kein statistischer Hinweis auf einen Einfluß von DDT auf den durch Pentetrazol induzierten Krampfanfall. Trotz steigender DDT-Konzentrationen im Gehirn wurden Krampfanfälle bei

annähernd gleichbleibenden Pentetrazol-Konzentrationen im Gehirn hervorgerufen. (siehe Abb. 13 b) Bei Hexachlorbenzol dagegen (siehe Abb. 13 c) ergab sich eine statistische Beziehung zwischen der Anwesenheit von Hexachlorbenzol im Gehirn und der krampfauslösenden Wirkung von Pentetrazol. Es zeigte sich, daß mit steigenden Konzentrationen von Hexachlorbenzol im Gehirn auch die jenigen Pentetrazol-Konzentrationen im Gehirn anstiegen, bei welchen ein Krampfanfall ausgelöst wurde.

Abb. 13 Beziehung zwischen der krampfauslösenden Konzentration von Pentetrazol im Gehirn und den Konzentrationen von Dieldrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol im gleichen Organ

Diese Konzentrations-Wirkungsbeziehungen wurden 24 Stunden nach Verabreichung von Dieldrin (Abb. 13a) und von p,p-DDT (Abb. 13b) sowie 48 Stunden nach Gabe von Hexachlorbenzol (Abb. 13c) angefertigt. Jeder Punkt in den Abbildungen gibt die Beziehung der untersuchten Substanzen bei einem Versuchstier wieder. An den Ordinaten wurden Mittelwerte und Standardabweichung der unvorbehandelten Kontrollen eingezeichnet.

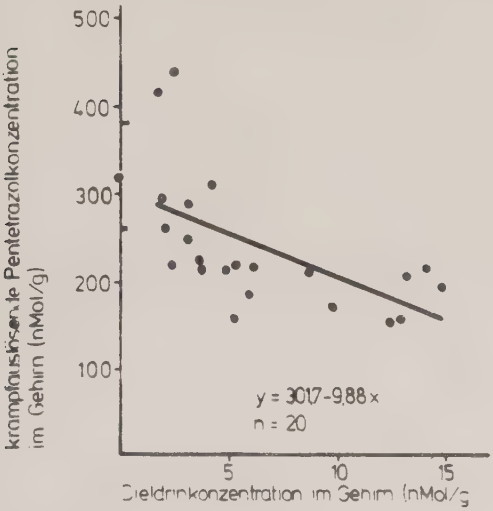


Abb. 13 a

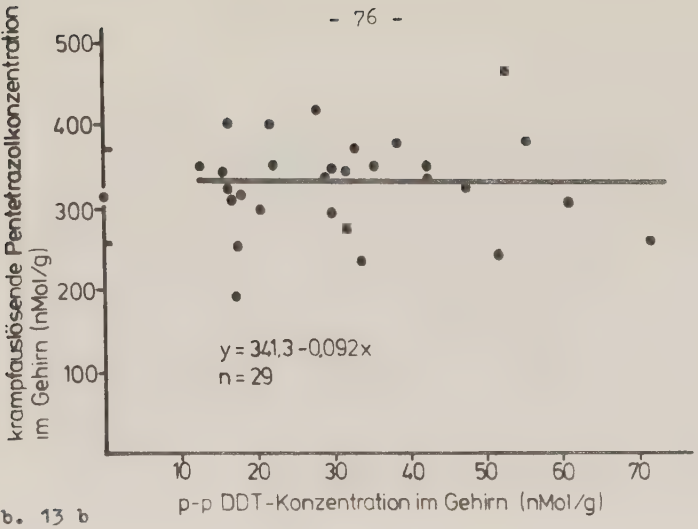


Abb. 13 b

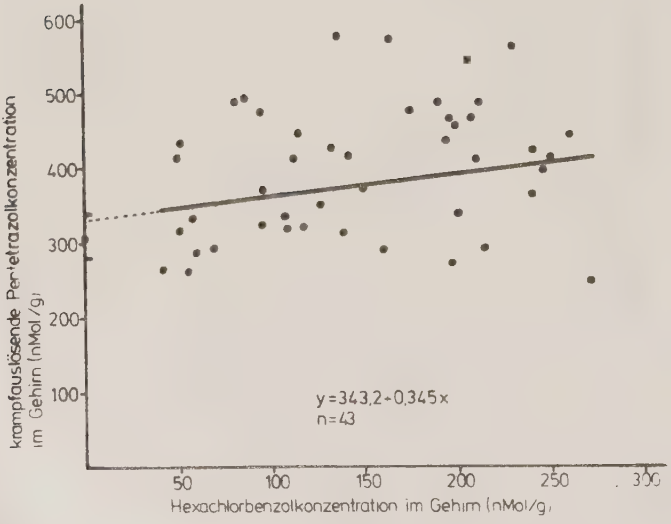


Abb. 13 c

3.5 Biotransformation von Pentetrazol in der Leber unter dem Einfluß von Dieldrin, p,p-DDT, Hexachlorbenzol und Phenobarbital

Die drei untersuchten Chlorkohlenwasserstoffe können bei Warmblütern nach akuter wie nach chronischer Aufnahme den Stoffwechsel sowohl körperfremder wie körpereigener Stoffe beeinflussen. Daher wurde in weiteren Versuchen geprüft, ob die einmalige Applikation von Dieldrin, p,p-DDT oder Hexachlorbenzol in vitro den Stoffwechsel von Pentetrazol verändern können.

Aus den Lebern unvorbehandelter Kontrolltiere wurden drei Zellfraktionen (10 000 x g; Mikrosomenfraktion; Hyaloplasma) präpariert und auf ihre Fähigkeit Pentetrazol zu metabolisieren untersucht. Hier zeigte sich (Tab. 9) eine Biotransformation von Pentetrazol im 10 000 x g Überstand und in der Mikrosomenfraktion. Die Umsatzraten waren, bezogen auf den Stickstoffgehalt der Enzympraeparation, in der Mikrosomenfraktion nahezu doppelt so hoch wie im 10 000 x g Überstand. Im Hyaloplasma konnte unter den gewählten Bedingungen keine Biotransformation nachgewiesen werden.

Enzympräparation	Pentetrazolbiotransformation in nMol PTZ / mg N/h
10000 X g Überstand	30,3 +- 4,2
100000 X g Überstand	kein Umsatz meßbar
Mikrosomenfraktion	91,6 +- 22,4

Tab.10

Biotransformation von Pentetrazol in vitro durch verschiedene Leberzellfraktionen unvorbehandelter weiblicher Ratten

Die angegebenen Umsatzraten sind Mittelwerte und Stndard-abweichungen aus insgesamt fünf Versuchen, bei denen jeweils die Lebern von vier unvorbehandelten Versuchstieren als Enzympräparationen aufgearbeitet werden. Einzelheiten der Inkubationsbedingungen s. Methoden.

In weiterführenden Experimenten wurde die Biotransformation von Pentetrazol in den Lebern von Versuchstieren untersucht, die 4 Tage vorher eine einmalige Applikation von p,p-DDT, Dieldrin oder Hexachlorbenzol erhalten hatten. Zum Vergleich wurden einige Versuchstiere über 4 Tage einer Vorbehandlung mit Phenobarbital unterzogen.

Wie die Werte in Abb. 14 erkennen lassen, bewirken alle eingesetzten Substanzen eine Beschleunigung der Biotransformation von Pentetrazol. Die Beschleunigung ließ sich in vergleichbarer Weise im 10 000 x g Überstand und in der Mikrosomenfraktion nachweisen. In beiden Zellfraktionen führte die Vorbehandlung mit Phenobarbital zur stärksten Beschleunigung der Biotransformation von Pentetrazol. Die Umsatzraten wurden nahezu vervierfacht. Der stimulierende Einfluß der chlorierten Kohlenwasserstoffe war dagegen etwas schwächer ausgeprägt. Während DDT zu einer etwa dreimal so hohen Umsatzrate für Pentetrazol führte, war dieser Effekt beim Hexachlorbenzol und Dieldrin doppelt so groß.

Auch nach Vorbehandlung mit Phenobarbital oder den genannten chlorierten Kohlenwasserstoffen ließ sich im Hyaloplasma der Lebern keine Biotransformation von Pentetrazol erkennen.

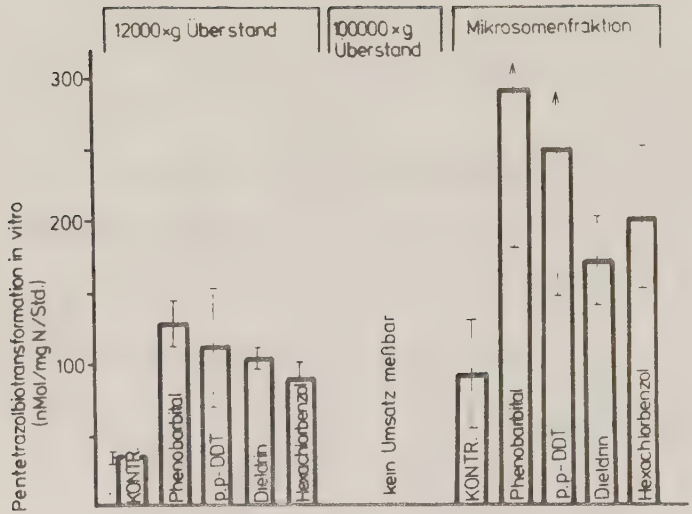


Abb. 14 Biotransformation von Pentetrazol durch Leberzellfraktionen in vitro. Einfluß einer einmaligen Vorbehandlung der Versuchstiere mit Dieldrin, p,p-DDT und Hexachlorbenzol

Tiere: 90-110 g, weiblich, ad libitum ernährt; Präparation der Leberzellfraktionen und Inkubationsbedingungen s. Methode.
Applikation der Chlorkohlenwasserstoffe einmalig vier Tage vor Präparation der Leberzellfraktion.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung von fünf Versuchen, bei denen jeweils die Lebern von 4 vorbehandelten und 4 unvorbehandelten Versuchstieren als Enzympräparation aufgearbeitet wurden.

3.6 Elimination von Pentetrazol aus dem Zentralnervensystem nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Dieldrin, pp-DDT oder Hexachlorbenzol

Nachdem sich in vitro gezeigt hatt, daß die Vorbehandlung der Versuchstiere mit chlorierten Kohlenwasserstoffen zu einer beschleunigten Biotransformation von Pentetrazol führt, war es sinnvoll zu prüfen, ob diese beschleunigte Biotransformation auch in vivo zu einer rascheren Elimination von Pentetrazol aus dem Zentralnervensystem führt. Daher wurde 4 Tage nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit Dieldrin, p,p-DDT oder Hexachlorbenzol eine einmalige Pentetrazoldosis von 40 mg/kg Körpergewicht subkutan injiziert und die Konzentrationsänderungen im Zentralnervensystem untersucht.

Wie Abb. 15 zeigt, fanden sich 30 Minuten nach der Injektion annähernd gleiche Pentetrazol-Konzentrationen in den Gehirnen von vorbehandelten und nicht vorbehandelten Tieren. Vier Stunden nach der Pentetrazol-Injektion zeigte sich jedoch, daß die Pentetrazol-Konzentrationen in den Gehirnen der vorbehandelten Versuchstiere stärker abgefallen waren, als in den Gehirnen der unvorbehandelten Kontrollen. Acht Stunden nach Versuchsbeginn war dieser Unterschied noch deutlicher ausgeprägt. Während bei unvorbehandelten Kontrollen die Pente-

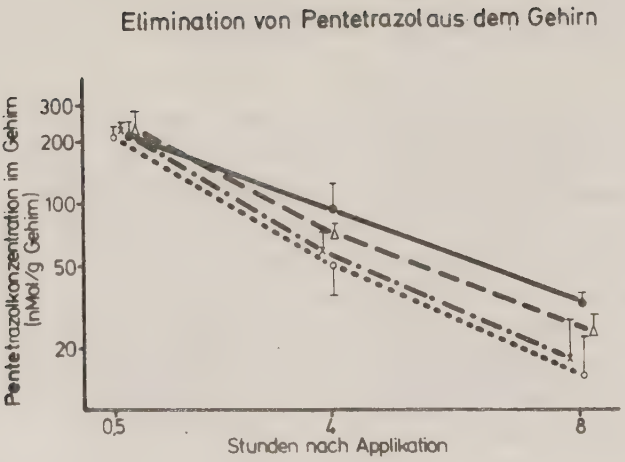


Abb. 15 Beschleunigte Elimination von Pentetrazol aus dem Gehirn nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit Dieldrin, p,p-DDT oder Hexachlorbenzol

Pentetrazol: 40 mg/kg s.c. (= 290 µMol/kg), 0,8%ig in Wasser

Vorbehandlung: Dieldrin (-x-) 30 mg/kg i.p.
p,p-DDT (-o-)200 mg/kg i.p.
Hexachlorbenzol (-Δ-) 200 mg/kg i.p.
Kontrollen (-o-) 5 ml Rapsöl/kg i.p.

Alle Substanzen einmalig vier Tage vor der Pentetrazolgabe.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung von 4-10 Einzelversuchen.

trazol-Konzentrationen im Gehirn zu diesem Zeitpunkt auf etwa 16 % der Höchstwerte abgesunken waren, betrugen die Pentetrazol-Konzentrationen in den Gehirnen der DDT-vergifteten Tiere nur noch 5 - 7 % der Spitzenwerte. Bei unvorbehandelten Versuchstieren ließ sich für die Elimination von Pentetrazol aus dem Gehirn eine Halbwertzeit von etwa 3 - 3,5 Stunden abschätzen. Diese war bei den Hexachlorbenzol-vorbehandelten Versuchstieren auf etwa 2,3 Stunden, bei den Dieldrin-vergifteten Tieren auf etwa 2 Stunden und bei den p,p-DDT-vergifteten Tieren auf etwa 1,6 Stunden verkürzt.

Vergleichbar zu den in vitro gefundenen Ergebnissen, daß die mit Hexachlorbenzol vorbehandelten Tiere die geringste und die mit p,p-DDT vorbehandelten Versuchstiere die stärkste Beschleunigung in der Biotransformation von Pentetrazol zeigten, waren auch bei den in vivo - Versuchen die Relationen gleich. Die mit Hexachlorbenzol vorbehandelten Tiere zeigten die geringste und die mit p,p-DDT vorbehandelten Tiere die stärkste Beschleunigung der Pentetrazol-Elimination aus dem Gehirn.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Wechselwirkungen zwischen chlorierten Kohlenwasserstoffen und zentral erregenden Substanzen analysiert und damit Untersuchungen fortgeführt, in denen gezeigt worden war, daß 4 Hexachlorcyclohexanisomere, DDT und Dieldrin bei Ratten eine Toleranz gegenüber mehreren in ihrer chemischen Zusammensetzung, ihrem Stoffwchsel und in ihrem Angriffspunkt verschiedene Krampfgiften (Pentetrazol, Paraoxon, Scillirosid, Strychnin und Nikethamid) auslösen können (HERKEN 1950, 1951; NEUBERT und SCHAEFER 1958, GHAZAL ET AL! 1964). Weiterführende Experimente erlaubten später auch einen gewissen Einblick in die Natur dieser Wechselbeziehung. So ergab sich eine enge Beziehung zwischen einer beschleunigten Biotransformation von Paroxon, Scillirosid und Nikethamid im Organismus von Hexachlorcyclohexan-, DDT- und Dieldrin-vergifteten Tieren und dem Wirkungsverlust dieser Krampfgifte (KORANSKY ET AL. 1964, GHAZAL ET AL. 1964, PORTIG ET AL. 1972). Für den Wirkungsverlust des Pentetrazols, der auch dann eintritt, wenn das Krampfgift intravenös am Beta-Hexachlorcyclohexan vergifteten Tier verabreicht wird (HERKEN ET AL. 1952), könnten zwei Angriffspunkte für die Wechselwirkung verantwortlich sein. Zum einen können die Hexachlorcyclohexane die Biotransformation von Pentetrazol beschleunigen und damit zu einer rascheren Elimination des Krampfgiftes aus dem Serum führen (VOHLAND und KORANSKY 1972). Die beschleunigte Biotransformation von

Pentetrazol durch a-Hexachlorcyclohexan - vorbehandelte Tiere kann jedoch den Wirkungsverlust nicht erklären. Hier zeigte sich vielmehr, daß generalisierte Krampfanfälle bei Alpha-Hexachlorcyclohexan-vorbehandelten Tieren erst bei wesentlich höheren Pentetrazolkonzentrationen im Gehirn ausgelöst werden als bei Kontrolltieren, daß Alpha-Hexachlorcyclohexan demnach zu einer verminderten Empfindlichkeit des Gehirns für Pentetrazol führen kann. Diese reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Pentetrazol steht in einer direkten Beziehung zur Anwesenheit nicht nur von a-Hexachlorcyclohexan im Gehirn (VOHLAND ET AL. 1972), sondern auch von Beta-, Gamma- und Delta-Hexachlorcyclohexan (VOHLAND unveröffentlichte Befunde).

Die genannten Experimente mit den 4 Hexachlorcyclohexanisomeren lassen erkennen, daß das Nervensystem Hexachlorcyclohexanvergifteter Versuchstiere unempfindlicher für die krampfauslösende Wirkung von Pentetrazol ist. Sie ergaben noch keinen Einblick in den Mechanismus dieser Toleranz. Hier bestand nun die Hoffnung, über analog durchgeführte Versuche an Tieren, die mit DDT oder Dieldrin vorbehandelt worden waren, weiterzukommen, denn über Funktionsänderungen am Nervensystem DDT- oder Dieldrin-vergifteter niederer und höher organisierter Versuchstiere war mehr Information erhältlich als über Funktionsänderungen des Nervensystems, hervorgerufen durch Hexachlorcyclohexan (s. Übersichten NARAHASHI 1971, HRDINA ET AL. 1975).

Deshalb wurden in eigenen Versuchen ältere Experimente (GHAZAL ET AL. 1964, GHAZAL 1964) wieder aufgenommen. In diesen Arbeiten war gezeigt worden, daß Dieldrin, DDT, nicht aber dessen Metabolite, bei Ratten eine Toleranz gegenüber der convulsiven Wirkung von Pentetrazol erzeugen können. Da in diesen Experimenten lediglich geprüft worden war, ab DDT- oder Dieldrin-behandelte Tiere auf eine subcutan injizierte Dosis Pentetrazol mit einem Krampfanfall reagieren, war es nicht möglich zu differenzieren, ob die Ursache für die ausbleibende Wirkung von Pentetrazol in einer beschleunigten Biotransformation von Pentetrazol oder in einer verminderten Empfindlichkeit des Nervensystems für Pentetrazol zu suchen ist. In den jetzt durchgeführten Experimenten, in die auch Hexachlorbenzol miteinbezogen wurde, sollte daher eine Antwort auf folgende Fragen gesucht werden:

1. Können DDT, Dieldrin und Hexachlorbenzol nach einmaliger Applikation an Ratten den Stoffwechsel von Pentetrazol entscheidend beeinflussen?

2. Sind DDT, Dieldrin und Hexachlorbenzol in der Lage, die Empfindlichkeit des Nervensystems für die krampfauslösende Wirkung von Pentetrazol zu verändern?

ad 1) Bei der Durchsicht der Literatur hatte sich gezeigt, daß alle drei Chlorkohlenwasserstoffe die Biotransformation sehr verschiedener körperfremder

und auch mancher körpereigener Stoffe beschleunigen können. Beim DDT ist dieser Einfluß am längsten bekannt und umfaßt körpereigene Produkte, wie Hormone und körperfremde Stoffe, wie eine Vielzahl von Arzneimitteln (HART und FOUTS 1963, GHAZAL ET Al. 1964, SCHWABE und WENDLING 1967, s. Übersichten von CONNEY 1964, KUNTZMAN 1969, SELL und DAVISON 1973 u.a.). Die Mengen an DDT in der Nahrung, die bei Ratten eine Änderung in der Biotransformation von Fremdstoffen auslösen können, wurden in der Größenordnung von 1 - 5 mg DDT/kg Futter angegeben (FISHBEIN 1974). Vergleichbare Effekte werden auch von Dieldrin hervorgerufen (s. Übersicht SELL und DAVISON 1973, KUNTZMAN 1969) sowie von Hexachlorbenzol (GRANT ET AL. 1974, RAGAMANICKAM und RADMANABAN 1974, STONARD und NENOV 1974, STONARD 1975), wobei Dieldrin und Hexachlorbenzol schwächer wirksam sein sollen als DDT (DEN TANKELAER und VAN ESCH 1974). Über die Induktion hepatischer, vorwiegend in der Mikrosomenfraktion lokalisierter Enzyme hinaus können DDT und Dieldrin (s. Übersicht SCHULTE HERMANN 1974), aber auch Hexachlorbenzol (GRANT ET AL. 1974, RAGAMANICKAM und RADMANABAN 1974) eine Zunahme der Lebermasse hervorrufen, was die Stoffwechselkapazität dieses Organs weiter erhöhen kann.

Da auch Pentetrazol in der Leber unter Beteiligung mischfunktioneller Oxydasen der Mikrosomenfraktion verstoffwechselt wird (VOHLAND ET AL. 1972) und dabei in vitro die gleichen hydroxylierten Produkte entstehen, welche aus dem Urin isoliert werden konnten

(VOHLAND ET AL. 1974), war zu erwarten, daß DDT-, Dieldrin- und Hexachlorbenzol-vorbehandelte Versuchstiere Pentetrazol rascher metabolisieren würden als unvorbehandelte. Hier zeigte sich tatsächlich, daß die Lebern aller vorbehandelten Tiere pro Zeiteinheit etwa die doppelte bis dreifache Menge Pentetrazol metabolisieren, verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Hierbei war der Effekt der Chlorkohlenwasserstoffe insgesamt kleiner als derjenige nach Phenobarbitalvorbehandlung der Tiere. Die in vitro gefundene Beschleunigung der Metabolisierung von Pentetrazol bewirkt auch in vivo, daß Pentetrazol beschleunigt aus dem Zentralnervensystem von DDT-, Dieldrin- und Hexachlorbenzol-behandelten Versuchstieren verschwindet. Wird es aus dem Gehirn unbehandelter Kontrollen mit einer Halbwertzeit von etwa 3 - 3,5 Stunden eliminiert, so geschieht dies bei den vorbehandelten Tieren in etwa 1,6 - 2,3 Stunden. Der Einfluß von DDT, Dieldrin und Hexachlorbenzol ist damit in der gleichen Größenordnung zu sehen wie derjenige einer einmaligen Gabe von Alpha-Hexachlorcyclohexan (VOHLAND ET AL. 1972). Da Pentetrazol von den wichtigsten Organen der Ratte in gleicher Weise aufgenommen und wieder abgegeben wird (VOHLAND und ZUFELDE 1976), bedeutet dies, daß Pentetrazol nicht nur aus dem Gehirn, sondern auch aus dem gesamten Organismus der vorbehandelten Tiere rascher wieder verschwindet.

Sieht man jedoch diesen Einfluß von DDT, Dieldrin und Hexachlorbenzol in Beziehung zu dem kurzen Zeitintervall zwischen der subcutanen Pentetrazolinjektion und dem Beginn generalisierter Krampfanfälle 20 - 40 Minuten später, so wird deutlich, daß die beschleunigte Biotransformation von Pentetrazol im Organismus DDT-, Dieldrin- und Hexachlorbenzol-vergifteter Tiere nicht die Ursache sein kann für die verminderte krampfauslösende Wirkung bei DDT- und Dieldrin-vorbehandelten Versuchstieren (GHAZAL ET AL. 1964, GHAZAL 1964). Die Beschleunigung des Pentetrazolstoffwechsels führt nämlich erst nach 1 - 2 Stunden zu meßbar niedrigeren Pentetrazolkonzentrationen in den Gehirnen der vorbehandelten Versuchstiere. Es war daher sinnvoll zu prüfen, ob die einmalige Vorbehandlung von Tieren mit DDT oder Dieldrin zu einer Wechselwirkung mit Pentetrazol auf der Ebene des Zentralnervensystems führt.

ad 2) Der von GHAZAL (GHAZAL ET AL. 1964, GHAZAL 1964) erhobene Befund, daß DDT und Dieldrin bei Ratten eine Toleranz gegenüber der krampfauslösenden Wirkung von Pentetrazol bewirke, ließ sich nicht reproduzieren, wenn Pentetrazol intravenös bis zum Krampfanfall infundiert wurde und das Gehirn anschließend daraufhin untersucht wurde, welche Konzentrationen von Pentetrazol im Gehirn anwesend sein müssen, um einen generalisierten Krampfanfall

auszulösen. DDT-vergiftete Tiere zeigten bis zu 7 Tagen nach der Vorbehandlung und auch 24 Stunden nach Applikation steigender Dosen die gleichen Pentetrazolkonzentrationen im Gehirn zu Beginn des Krampfanfalles wie unvorbehandelte Kontrollen. Die seinerzeit beschriebene Toleranz DDT-vorbehandelter Tiere blieb aus, obwohl unverändertes DDT in Konzentrationen im Zentralnervensystem zu finden war, welche sich nicht wesentlich von den Angaben anderer Autoren, die ähnliche Dosen an Ratten verabreicht hatten, unterscheiden. (WOOLEY und RUNNELS 1967). Auch das dem p,p-DDT stereoisomere o,p-DDT, welches kaum insektizide Wirkung besitzt (HRDINA ET AL. 1975) und in technischem DDT in einem Anteil zwischen 8 - 21 % enthalten sein kann (FISHBEIN 1974), verhielt sich nicht anders. 24 Stunden und 4 Tage nach Applikation der beiden DDT-Isomere wurden bei vorbehandelten Tieren zu Beginn des Krampfanfalls etwa gleiche Konzentrationen von Pentetrazol im Gehirn gefunden, so daß nichts auf eine veränderte Empfindlichkeit des Gehirns für Pentetrazol hindeutet. Die während des generalisierten Krampfanfalles im Gehirn unvorbehandelter Kontrollen wie auch DDT-vorbehandelter Tiere gefundenen Pentetrazolkonzentrationen entsprachen denjenigen früherer Analysen bei Ratten (MARCUCCI ET AL. 1971, VOHLAND ET AL. 1972).

Mit Dieldrin vergifteten Tieren mußte in den ersten 5 - 6 Tagen nach Applikation einer einmaligen Dosis bis zum Beginn der Krampfanfälle deutlich weniger

Pentetrazol infundiert werden als Kontrollen. Die Analyse der Gehirne dieser Tiere ergab, daß generalisierte Krampfanfälle bei deutlich niedrigeren Pentetrazolkonzentrationen im Gehirn beginnen. Es ergab sich eine statistische Beziehung zwischen der Anwesenheit von Dieldrin im Gehirn und der Erniedrigung der krampfauslösenden Konzentrationen von Pentetrazol im gleichen Organ. Diese Sensibilisierung der Versuchstiere gegenüber Pentetrazol konnte bereits nach einer Vorbehandlung mit 2 mg Dieldrin/kg Tier festgestellt werden, welche 24 Stunden nach der Vorbehandlung zu einer Dieldrinkonzentration im Gehirn von 10 nMol/g (= 3,8 ppm im Frischgewebe) führte. Diese wirksamen Konzentrationen von Dieldrin stehen etwa 1 000 mal über denjenigen, welche z.B. im Gehirn von Menschen gefunden wurden (6 ppb im Frischgewebe, n = 29, DE VLIEGER ET AL. 1968; 2 - 40 ppb, n = 131, 2 - 3 ppb, n = 59, ORLOFFS ET AL. 1974, RADOMSKI ET AL. 1968). Die gesteigerte Empfindlichkeit Dieldrin-vergifteter Tiere gegenüber Pentetrazol steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von GHAZAL ET AL. 1964, in denen eine kurz anhaltende und im Vergleich zu den Hexachlorcyclohexanisomeren (HERKEN 1950, 1951) schwache Toleranz gegenüber Pentetrazol gefunden worden war, aber in Übereinstimmung mit späteren Untersuchungen, in denen ebenfalls eine erhöhte Sensibilität Dieldrin-vergifteter Tiere gegenüber

Pentetrazol beschrieben worden war (NATOFF und REIF 1967; WEISS und BRODIE 1968; MÜLLER 1973). Warum die früheren Befunde (GHAZAL ET AL. 1964, GHAZAL 1964) nicht reproduziert werden konnten, bleibt unklar. Unterschiedliches Tiermaterial (Gewicht, Alter), größere Streuungen in den wirksamen Pentetrazolkonzentrationen im Gehirn, welche nach subcutaner Injektion des Krampfgiftes zu beobachten sind, größere individuelle Schwankungen in der Empfindlichkeit der Versuchstiere gegenüber Pentetrazol sowie das nicht immer sehr scharfe Bild des Pentetrazolkrampfes können zu falschen Daten führen. Dies ist um so leichter möglich, wenn, wie im Falle des DDT und Dieldrins, die vermeintliche Toleranz gegenüber Pentetrazol nur relativ schwach ausgeprägt ist. Da in den Untersuchungen von GHAZAL (GHAZAL ET AL. 1964, GHAZAL 1964) nur das Ausbleiben der Pentetrazolkrämpfe bei einzelnen DDT- und Dieldrin-vergifteten Tieren registriert und nicht zusätzlich die wirksamen Substanzen bei jedem Tier im Gehirn bestimmt wurden, könnten einige der genannten Fehler auf der seinerzeit noch nicht hinreichend ausgefeilten Methodik beruhen.

Bei Tieren, die einmalig mit Hexachlorbenzol vorbehandelt worden waren, ergab sich ein zum Dieldrin entgegengesetztes Bild. Die Versuchstiere benötigten höhere Pentetrazoldosen zur Induktion von Krampfanfällen und wiesen während der generalisierten Krampfanfälle auch höhere Pentetrazolkonzentrationen im Gehirn auf. Sie waren daher weniger empfindlich

gegenüber Pentetrazol. Diese Toleranz stieg mit zunehmendem Hexachlorbenzolgehalt des Gehirns an, war aber im Vergleich zu denjenigen, welche nach Aufnahme von vier Hexachlorcyclohexanisomeren auftritt (VOHLAND ET AL. 1972, VOHLAND unveröffentlicht), nur sehr schwach ausgeprägt und mit relativ großen Schwankungen zwischen den einzelnen Individuen behaftet. Die Konzentrationen von Hexachlorbenzol, bei denen gerade eine verminderte Empfindlichkeit der Versuchstiere gegenüber Pentetrazol auftrat, liegen im Bereich von 130 und 150 nMol/g (50 - 55 ppm Hexachlorbenzol) im Gehirn.
Darüber hinaus liegen die Konzentrationsänderungen über die Zeit in der gleichen Größenordnung wie diejenigen, die andere Autoren an Hexachlorbenzolvergifteten Ratten fanden (KOSS und KORANSKY 1975, MORITA und OISHI 1975).
Warum mit Dieldrin vergiftete Tiere empfindlicher gegenüber Pentetrazol reagieren und mit Hexachlorbenzol behandelte unempfindlicher, kann im Augenblick nicht beantwortet werden, denn es ist noch nicht geklärt, auf welchem Wege Pentetrazol Krampfanfälle hervorruft.

Darüber lassen die in der Literatur beschriebenen Funktionsänderungen, welche DDT und Dieldrin am Gehirn von Warmblütern verursachen (siehe Übersichten HRDINA ET AL. 1975, NARAHASHI 1971), noch nicht erkennen, wieweit die erhobenen Befunde mit den beschriebenen Funktionsänderungen zusammenhängen.

Beim Hexachlorbenzol sind zur Zeit noch keine detaillierten Untersuchungen über Funktionsänderungen am Nervensystem des Warmblüters bekannt geworden. Es ist wohl bekannt, daß sich die untersuchten chlorierten Kohlenwasserstoffe als lipophile Substanzen in biologischen Membranen befinden (BRUNNERT und MATSUMURA 1969), deren Eigenschaften verändern (HOKIN und BROWN 1969) und membrangebundene Enzyme des Energiestoffwechsels und Elektrolytaustausches beeinflussen (KOCH 1969, 1971, CUTCOMB ET AL. 1971, DAVIS 1972 u.a.) können. Es ist daher vorstellbar, daß sie z.B. energieabhängige Transportvorgänge stören und so den aktiven Transport u.a. von Elektrolyten und die Elektrolytgradienten an den Membranen des Nervengewebes beeinflussen.
Ob ein Zusammenhang besteht zwischen den genannten Funktionsänderungen, die von DDT und Dieldrin ausgelöst werden, und der beobachteten Modifikation der Empfindlichkeit gegenüber Pantetrazol, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß einmaliger Applikationen der Chlorkohlenwasserstoffe Aldrin, Dieldrin, Endrin, DDT und Hexachlorbenzol auf die convulsive Wirksamkeit, die Biotransformationen und Pharmakokinetik von Pentetrazol untersucht.

Die Versuche wurden an Ratten durchgeführt, denen Pentetrazol intravenös in krampfauslösender Dosis infundiert wurde. Die Chlorkohlenwasserstoffe wurden intraperitoneal injiziert. Pentetrazol sowie die Chlorkohlenwasserstoffe wurden aus den Organen isoliert und quantitativ gaschromatographisch gemessen. Die Biotransformation von Pentetrazol wurde in Leberhomogenaten und in der Mikrosomenfraktion der Leber unter Einsatz von radioaktivem Pentetrazol studiert.

Nach intraperitonealer Injektion steigender Dosen von Aldrin, Dieldrin und Endrin sowie von DDT zeigten die Tiere dosisabhängig die in der Literatur beschriebenen Zeichen der Neurotoxizität, nämlich zunehmende Erregbarkeit, Tremor, Ataxie und Konvulsionen. Hexachlorbenzol wurde im akuten Versuch von allen Tieren ohne deutliche Störungen der Nerventätigkeit vertragen.

Endrin-, Dieldrin- und Aldrin- vergiftete Versuchstiere reagierten bereits nach Infusion kleinerer Dosen von Pentetrazol mit einem Krampfanfall. Diese Sensibilisierung gegenüber Pentetrazol sezte wenige Stunden nach der Dieldringabe ein und war für nahezu eine Woche nachweisbar. Sie war direkt abhängig von der applizierten Dosis. Mit steigenden Konzentrationen von Dieldrin im Gehirn verringerten sich diejenigen Pentetrazolkonzentrationen, die einen generalisierten Krampfanfall auslösen können.

Die einmalige Vorbehandlung mit DDT bewirkte bis zu 8 Tage nach Versuchsbeginn keine Veränderung der Reaktion der Versuchstiere auf krampfauslösende Dosen von Pentetrazol. Trotz steigender Konzentrationen von DDT im Gehirn werden Krampfanfälle bei den gleichen Pentetrazolkonzentrationen im Zentralnervensystem ausgelöst wie bei unvorbehandelten Kontrollen. Die isomeren Verbindungen p.p-DDT und o.p-DDT verhielten sich gegenüber pentetrazol-induzierten Krampfanfällen gleich.

Hexachlorbenzol führte dosisabhängig zu einer leichten Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber der krampfauslösenden Wirkung von Pentetrazol. 12 Stunden nach einmaliger Gabe von Hexachlorbenzol ist dieser Effekt nachweisbar. Er hielt bis zu 3 Wochen nach Versuchsbeginn an. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Anwesenheit von Hexachlorbenzol im Gehirn und der krampfauslösenden Konzentration von Pentetrazol.

Eine einmalige Vorbehandlung der Versuchstiere mit Dieldrin, p.p-DDT oder Hexachlorbenzol steigerte die Biotransformation von Pentetrazol durch Leberzellfraktionen, verglichen mit unvorbehandelten Kontrollen, um das 2 - 3-fache. p.p-DDT wirkte stärker als Hexachlorbenzol und Dieldrin.

Die beschleunigte Biotransformation von Pentetrazol im Organismus DDT-, Dieldrin- und Hexachlorbenzol-vergifteter Tiere führte auch zu einer beschleunigten Elimination von Pentetrazol aus dem Gehirn. Während Pentetrazol bei unvorbehandelten Kontrollen mit einer Halbwertzeit von etwa 3,5 Stunden aus dem Gehirn eliminiert wurde, war diese Zeit nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit p.p-DDT auf 1,6

Stunden, mit Dieldrin auf 2 Stunden und mit Hexachlorbenzol auf 2,3 Stunden verkürzt.

Diese Befunde sprechen dafür, daß Aldrin, Dieldrin und Endrin die Empfindlichkeit des Zentralnervensystems für die krampfauslösende Wirkung von Pentetrazol erhöhten, während Hexachlorbenzol zu einer Abnahme der Empfindlichkeit führte. DDT beeinflußte im untersuchten Dosisbereich die Wirkung von Pentetrazol nicht.

Die Behandlung der Versuchstiere mit Dieldrin, DDT oder Hexachlorbenzol führte zwar zu einer deutlich beschleunigten Biotransformation von Pentetrazol und auch zu seiner beschleunigten Elimination aus dem Gehirn. Die Beeinflussung des Pentetrazolstoffwechsels ist jedoch nicht für die veränderte konvulsive Wirksamkeit von Pentetrazol verantwortlich.

1. ABBOTT C.C. : Organochlorine Pesticide Residues in Human Fat in the United Kingdom 1969 - 1971 British Medical J. 3 June 553, 1972

2. ACKER L. u. SCHULTE F.: Zum Vorkommen von Hexachlorbenzol polychlorierten Biphenylen neben chlorierten Insektiziden in menschlichem Fettgewebe und in Humanmilch, Ernährungsforschung 4, 559, 1971

3. BAKKEN A.F. u. SEIP M.: Insecticides in Human Breast Milk Acta Paediatr. Scand. 65: 535-539, 1976

4. CAM . C. : Une nouvelle Dermatose épidémique des enfants Ann Derm. 87, 393-397, 1960

5. CONNEY A.H. : Pharmacological-Implikations of Mikrosomal Enzyme Induction, Pharmacological Reviews, Vol 19, Nr. 3

6. CUTKOMP L. K. : ATPase Activity in Fish Tissue Homogenates and Inhibitory Effects of DDT and Related Compounds Chem. Biol. Interactions 3, 439-447, 1971

7. DAVIS P.W. ET AL. : Organochlorine Insecticide, Herbicide and polychlorinated Biphenyl (PCB), Inhibition of NAK-ATPase in Rainbow Trout, Bull Environm. Cont. Toxicol. 8, 69, 1972

8. DEICHMANN W.B.: Effects of Starvation in Rats with Elevated DDT and Dieldrin Tissue Levels, INT.Arch.Arbeitsmed. 29, 233-252, 1972

9. DE MATTEIS ET AL. : Nervous and Biochemical Disturbances Following Hexachlorobenzene Intoxication, Nature July 22, 1961 Vol 191, 363 - 366

10. DYMANT P.G. : Relationship between Chlorinated Hydrocarbon Insecticides in Human Milk and Serum, Bull of Environm. Contamination and Toxicology 6,5, 449, 1971

11. FISHBEIN : Chromatographic and Biological Aspects of DDT and its Metabolites, J. of Chromatogr. 78, 177-251, 1974

12. THOMAS B. GAINES : The Acute Toxicity of Pesticides to Rats, Toxicol. Appl. Pharmacol. 2, 88 - 99, 1960

13. GARETTSON ET AL : Dieldrin: Studies in a Poisoned Child, Arch. Environm. Health 19, 814, 1969

14. GHAZAL A. : Beschleunigung von Entgiftungsreaktionen durch verschiedene Insektizide, Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path. u. Pharmak. 249, 1-10, 1964

15. GHAZAL A. : Chlorophenothane (DDT) and Glutamine in Pentylenetetrazole (Cardiazol) Convulsions in the Rat, Toxicol and Appl. Pharm. 6, 627 - 630, 1964

16. GLASS W.J. : Dieldrin Poisoning: Case Report New Med. J. 26, 202, 1975

17. GRANT D.L. : Effects of Hexachlorobenzene on Liver Porphyrin Levels and Microsomal Enzymes in the Rat, Envir. Physiol.Biochem. 4, 159, 1974

18. HART L.G. and FOUTS J.R. : Effects of acute and chronic DDT Administration on Hepatic Microsomal Drug Metabolism in the Rat, Proc.Soc.exp.Biol. 114, 388, 1963

19. HERKEN H. : Zur Pharmakologie u. Toxikologie chlorierter Cyclohexane, Arch. Exper. Path. u. Pharmakol. Bd. 212, S. 463, 1951

20. HINT H.C., RICHTER : A Simpel Intravenous Infusion Technique for Mice, Acta Pharmacol. et Toxicol. 44, 153-157, 1958

21. HODGE H.C., A.M. BOYCE, W.B.DEICHMANN, H.F. KRAYVILL : Toxicology and No-Effect Levels of Aldrin and Dieldrin, Toy.Appl.Pharm. 10, 613-675, 1967

22. HOKIN M.R. and BROWN D.F. : Inhibition by Y-Hexachlorcyclohexan of Acetylcholine-stimulated Phosphatidylinositol Synthesis in Cerebral Cortex Slices and of Phosphalidic Acid-Inositol Transferase in Cerebral Cortex Particulate Fractions Journal of Neurochemiestry 1969, Vol 16 pp. 475 to 483

23. HRDINA P.D. : DDT and Related Chlorinated Hydrocarbon Insecticides, Pharmacological Basis of their Toxicity in Mammals, Advances in Pharmacology and Chemotherapie, Vol. 12, 31, 88, 1975

24. JAGER Kl. W. : Aldrin, Dieldrin, Endrin and Telodrin: An Toxicological Study of Long-Term Occupational Exposure, Elrevier Publishing Company,Amsterdam 70

25. KHERA K.S. : Teratogenicty and Dominant Lethal Studies on Hexachlorbenzene in Rats, Pd. Cosmet. Tox. 12, 471-477, 1974

26. KLIMMER O.R. : Abriß einer Toxikologie und Therapie von Vergiftungen, Hundt-Verlag 1971

27. KLIMMER O.R. : Experimentelle Untersuchungen über die Toxikologie insektizider, chlorierter Kohlenwasserstoffe, Arch. Exper.Path. u. Pharm. 227, 183-195, 1955

28. KORANSKY W. u.a. : Die Elimination von Alpha- und Gamma-Hexachlorcyclohexan und ihre Beeinflussung durch Enzyme der Lebermikrosomen, Arch Exp. Path. u. Pharmak. 247, 49-60, 1964

29. KOSS G. u. KORANSKY W.: Studies on the Toxicology of Hexachlorbenzene, I Pharmacokinetics Arch. Toxicol. Vol. 34, 203-212, 1975

30. KOCH R.B. : Inhibition of Oligomycin Sensitive and Insensitive Fish Adenosin Triphoshatase Activity by Chlorinated Hydrocarbon Insecticides Biochem. Pharmacol Vol. 20 pp, 3243-3245, 1971

31. KOCH R.B. : Chlorinated Hydrocarbon Insecticides: Inhibition of Rabbit Brain ATPase Activities J. Neurochem. 16, 269, 1969

32. KRAUL I. u. KARLOG O.: Persistent Organochlorinated Compounds in Human Organs, Collected in Denmark 1972 - 73, Acta Pharm. and Toxicol. 38, 38 - 48 , 1976

33. KUNTZMAN R. : Druges and Enzyme Induction Ann. Rev. Pharm. 9, 21, 1969

34. MARCUCCI F. : Brain Levels of Metrazol, Determined with a New Gas-Chromatographic Procedure, Europ. J. Pharmacol. 16, 219, 1971

35. MATZUMURA F. : DDT: Current Theories on its Mechanism of Poisoning, Yale Scientific Magazine 6 - 10, 1969

36. MILLER P.E. : Brain Serotonin Level and Pentylenetetrazol Seizure Threshhold in Dieldrin and Endrin Treated Mice, Proc. Western Pharm. Soc. 16, 195-197, 1973

37. MORITA M. : Clearance and Tissue Distribution of Hexachlorbenzene in Rats, Bull of Environm. Contam. and Toxicology Vol. 14, 3, 313, 1975

38. NARAHASHI T. : Effects of Insecticides on Excitable Tissues, Adv. in Insect. Physiol. Vol. 8, 1, 1971

39. NATOFF I.L. and B. REIFF: The Effect of Dieldrin (HEOD) on Chronaxie and Convulsion Threshhholds in Rats and Mice, Br.J.Pharmacol. 31, 197-204, 1967

40. NEUBERT D. u. SCHAEFER J.: Wirkungsverlust d. Diathyl-p- Nitrophenylphosphats und Oktamethylpyrophosphoramids nach Vorbehandlung mit Alpha-Hexachlorcyclohexan, Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 233, 151, 1958

41. OLOFFS P.C.: DDT, Dieldrin and Heptachlor Epoxide in Humans with Liver Cirrhosis, Clinical Biochemistry 7, 297, 1974

42. PETERS H.A. : Hexachlorbenzene Poisoning in Turkey, Fld. Proceedings 35, 12, 1976

43. PORTIG J. et.al.: Biodegradation of Alpha-Hexachlorcyclohexan, Arch. Pharmacol 279, 199-202 , 1973

44. RADOMSKI J.L. : Pesticide Concentrations in the Liver, Brain and Adipose Tissue of Terminal Hospital Patients, Toxicol 6, 209-220, 1968

45. RAJAMANICHAM C. and PADMANABAN G. : Biochemical Effects of Hexachlorbenezene Ind. J. of Biochem. and Biophys. 11, 119-122, 1974

46. SCHULTE-HERRMANN R.: Induction of Liver Growth by Xenobiotic Compounds and other Stimuli, Critical Reviews in Toxicology 3, 97-158, 1974

47. SCHWABE U. u. WENDLING J : Beschleunigung des Arzneimittelabbaus durch Kleine Dosen von DDT und anderen Chlorkohlenwasserstoff-Insekticiden Arzneim. Forsch. 27, 614, 1967

48. SELL I.C. : Changes in the Activities of Hepatic Microsomal Enzymes caused by DDT and Dieldrin Fed. Proc. 32, 2003, 1973

49. SIGALI D.S.: Polychlorinated Biphenyls, Hexachlorobenezene and other Organochlorine Pesticides in Human Milk, Medical J. of Australia 2, 815, 1973

50. STONARD M.D. : Effect of Hexachlorobenzene on Hepatic Microsomal Enzymes in the Rat, Biochem. Pharm. Vol. 23, 2175-2183, 1974 (and Nenov P.Z.)

51. STONARD M.D. : Mixed Type Hepatic Microsomal Enzyme Induction by Hexachlorobenzene, Biochem. Pharm. Vol. 24, 1959-1963, 1975

52. TOLLE A. et al. : Fremdstoffe in Milchnahrungen Mschr. Kinderheilkunde 122, 309-318, 1974

53. TONKEULAER DEN : No-Effect Levels of Organochlorine Pesticides Based on Induction of Microsomal Liver Enzymes in Short-Term Toxicity Experiments, Toxicology 2, 371-380, 1974 (u. VAN ESCH)

54. TURNER J.C. und GREEN R.S. : Effect of Hexachlorobenzene on Microsomal Enzyme Systems, Biochem. Pharmacol. 33, 2387, 1974

55. VOHLAND H.W. : Effect of Alpha-HCH on the Convulsive Activity of PTZ (Cardiazol) in the Rat, Naunym-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol, 275, 289-298, 1972

56. VOHLAND H.W. und KORANSKY W. : Effect of Hexachlorocyclohexane on Metabolism and Excretion of Pentetrazol (Cardiazol) in the Rat, Naunym-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 273, 99-108, 1972

57. VOHLAND H.W. : Stoffwechsel von Pentetrazol bei der Ratte, Hoppe Seylers Z. physiol. Che. 355, 1274-1280, 1974

58. VOHLAND H.W., ZUFELDE H. : Factors responsible for reduced Pharmacological Activity in Rats of Pentetrazol Administered Orally, Naunym-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, 277-283, 1976

59. VLIEGER DE M. u.a. : The Organochlorine Insecticide Content of Human Tissues, Arch. Environm. Health, 17, 759, 1968

60. WEISS L.R. und BRODIE R. : The Effect of Several Pesticides and Drug Combinations on Some Behavioral and CNS Responses in Rats. Toxocol.Appl. Pharm. 12, 288, 1968

61. WOODLEY D.E. and RUNNELS A.L. : Destribution of DDT in Brain and Spinal Cord of the Rat, Toxicol. Appl. Pharm. 11, 375-389, 1967

Lebenslauf :

Am 14. Februar 1947 wurde ich als Sohn der Eheleute Dr. phil. Willi Tonn und Dr. med. dent. Elisabeth Tonn, geb. Wiegel, in Dortmund geboren.

Von Ostern 1953 - 1958 besuchte ich die Liebig-Volksschule in Dortmund. Von 1958 - 1965 war ich am Max-Planck-Gymnasium in Dortmund und wechselte 1965 in das Landschulheim Schloß Heessen bei Hamm, wo ich im Sommer 1967 das Abitur machte. Zum Wintersemester 1967/68 immatrikulierte ich mich an der Philipps-Universität in Marburg, um das Studium der Zahnheilkunde aufzunehmen.

Am 18. Juli 1973 erhielt ich die Bestallungsurkunde als Zahnarzt. Danach vervollständigte ich den praktischen Teil meiner Inauguraldissertation. Ab September 1974 war ich als Assistent in Castrop-Rauxel tätig. Von Herbst 1975 - 1977 wechselte ich als Assistent an eine kieferchirurgische Praxis in Dortmund.

Seit Beginn des Jahres 1977 bin ich als Stabsarzt in der Bundeswehrzahnstation in Hemer.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Castenholz, Dimrath, Haan, Hamelmann, Hennis, Hering, Heuser, Hort, Janke, Karlson, Keil, Koch, Koecke, Korb, Kühnel, Mahr, Niemeyer, Oepen, Pantke, Petry, Pfütz, Riecken, Rohen, Rosemann, Rupec, Schienbein, Schiff, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnell, Seidel, Strohmeyer, Stuke, Walcher, Wolter.

Herzlicher Dank gebührt Herrn Dr. med. H.W. VOHLAND, von dem die Anregung zur vorliegenden Arbeit ausging. Er stand mir mit Rat und Tat zur Seite.

Besonderen Dank schulde ich ferner Frau Streichert für die tatkräftige Hilfe beim praktischen Teil der Arbeit.